



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

MIKHAEL P. M. VIVAS

**Desenvolvimento de metodologia analítica para determinação de
interferentes endócrinos em amostras de água por UFLC-MS**

Salvador
2020

MIKHAEL PEREIRA MARQUES VIVAS

Desenvolvimento de metodologia analítica para determinação de interferentes endócrinos em amostras de água por UFLC-MS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Química – Área de Concentração em Química Analítica – da Universidade Federal da Bahia, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre

Orientadora:

Prof.^a. Dr.^a. Gisele Olímpio da Rocha

Salvador
2020

AGRADECIMENTOS

À Prof.^a. Dr.^a. Gisele Olímpio da Rocha, pela oportunidade, orientação e todas as contribuições realizadas durante este período.

À minha família, em especial à minha Mãe, Nubia Pereira Marques, pelo apoio e incentivo por todo período da minha vida.

Ao meu “pai-avô” Antônio Rosa Marques, por ter me acompanhado e guiado durante toda minha vida como exemplo de figura masculina e de honestidade.

Ao meu pai Anísio Vivas pelo apoio indispensável durante esta trajetória e pelas longas conversas e planejamento pessoal durante esta etapa.

À contribuição de todos os amigos e colegas de pesquisa, Elisvan Mota, Madson Nascimento, Rafael Castro e Sabrina Martinez pelo companheirismo, amizade, conselhos, incentivo e pelos bons momentos vividos durante o curso.

À minha companheira Camila Magalhães por fornecer apoio e suporte emocional em todos os momentos.

À Universidade Federal da Bahia, pela oferecida oportunidade de realizar o curso de Pós-Graduação.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa concedida.

À FAPESB, CAPES, INCT Energia & Ambiente por dispor recursos e infraestrutura para realização deste trabalho.

RESUMO

Interferentes endócrinos (IEs) são espécies com potencial de afetar a capacidade do sistema endócrino em vários níveis, atuando na biossíntese de esteroides e ou receptores de estrogênio ($ER\alpha$ e $ER\beta$), resultando na inibição, bloqueio ou exacerbando a atividade do sistema endócrino. O desequilíbrio do sistema endócrino afeta diretamente a capacidade reprodutiva das espécies, e pode também causar feminização e hermafroditismo em aves, peixes e mamíferos. Em seres humanos, os IE podem promover a puberdade precoce nas meninas, diminuição da qualidade e quantidade do sêmen nos homens e diversos problemas de saúde como câncer, diabetes e obesidade. Nesse trabalho foi desenvolvido um método cromatográfico para a determinação de 14 IEs, dentre estes o bisfenol A (BPA), estriol (E3), estrona (E1), 17β -estradiol (E2), 17α -etinilestradiol (EE2), 4-*n*-nonilfenol (4-*n*-NP), 4-*n*-octilfenol (4-*n*-OP), 4-*t*-octilfenol (4-*t*-OP), dimetilftalato (DMP), dietilftalato (DEP), butilbenzil ftalato (BBP), di-*n*-butilftalato (DBP), di(2-etilhexil) ftalato (DEHP) e di-*n*-octil ftalato (DnOP). A metodologia foi desenvolvida utilizando um cromatógrafo líquido ultra-rápido acoplado a um espectrômetro de massas, a fase móvel utilizada foi uma combinação binária água (A) /acetonitrila (B), coluna Shim-pack XR-Phenyl (100 x 2.0 mm, 2.20 μ m) e um sistema de microextração sólido-líquido dispersivo. O tempo de corrida foi de 15 minutos, com repetibilidade variando entre 2,85% (BPA) a 17,6 % (DEHP) no teste de precisão intermediária. Os limites de detecção variaram de 21 ng L⁻¹ (BPA) a 870 ng L⁻¹ DBP, e a linearidade entre 0,9724 (E2) a 0,9972 (DEP).

Palavras-chave: contaminantes emergentes, microextração, cromatografia líquida

ABSTRACT

Endocrine disruptors (ED) are species with the potential to affect endocrine system capacity at various levels, acting on steroid biosynthesis and or estrogen receptors (ER α and ER β), resulting in inhibition, blocking or promoting endocrine system activity. Imbalance of the endocrine system directly affects the reproductive capacity of the species, reports of feminization of the population of bird, fish and mammal species can be found in the literature. In humans these substances can promote early puberty in girls, decrease the quality of semen in men and various health problems such as cancer, diabetes and obesity. In this work, a chromatographic method was developed for the determination of 14 IEs, including: Bisfenol A (BPA), estriol (E3), estrone (E1), 17 β -estradiol (E2), 17 α -etinilestradiol (EE2), 4-*n*-nonylphenol (4-*n*-NP), 4-*n*-octylphenol (4-*n*-OP), 4-*t*-octylphenol (4-*t*-OP), dimethylphthalate (DMP), diethylphthalate (DEP), butylbenzylphthalate (BBP), di-butylphthalate (DBP), di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) and di-*n*-octyl phthalate (DnOP). The methodology was developed using an ultra-fast liquid chromatograph coupled to a mass spectrometer, using as a mobile phase a binary water (A) / acetonitrile (B) combination, a Shim-pack XR-Phenyl column (100 x 2.0 mm, 2.20 μ m) and a dispersive solid-liquid microextraction system. The running time was 15 minutes, with repeatability ranging from 2.85% (BPA) to 17.6% (DEHP) in the intermediate precision test. The LOD ranged from 21 ng L⁻¹ (BPA) to 870 ng L⁻¹ (DBP), and the linearity between 0.9724 (E2) to 0.9972 (DEP).

Keywords: Emerging contaminants, microextraction, liquid chromatography

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-Estrutura molecular do ciclopenta[α]fenantreno.	18
Figura 2 Estrutura molecular dos Hormônios naturais Estrona (E1) , 17 β -estradiol (E2), Estriol (E3) e sintético 17 α -etinilestradiol (EE2).	19
Figura 3: Estrutura molecular do Bisfenol A (CH ₃) ₂ C(C ₆ H ₄ OH) ₂	20
Figura 4 Competição do Bisfenol A por receptores de estrogênio (α e β), inibindo a atuação do hormônio 17 β -estradiol.....	Erro! Indicador não definido.
Figura 5. Estrutura molecular dos Alquilfenóis 4-t-Octilfenol (4-t-OP), 4-n-Octilfenol (4-n-OP), 4-n-Nonilfenol (4-n-NP).	22
Figura 6: Estrutura genérica dos ftalatos.....	Erro! Indicador não definido.
Figura 7 Estrutura molecular dos ftalatos Dimetilftalato(DMP), Dietilftalato (DEP), Dibutilftalato (DBP), Di-n-octilftalato(DnOP), Butilbenzilftalato (BBP) e Di(2-etilhexil) ftalato (DEHP).....	25
Figura 8 Dimensões do dispositivo customizado de extração desenvolvido para este trabalho, tubo cilíndrico de dimensão 150x20mm com uma ponta de 45x9mm em uma das extremidades e uma tampa na extremidade oposta.	39
Figura 9. Diagrama representativo do processo de extração em 11 etapas.....	41
Figura 10 Adsorventes testados para o processo de extração: A(C18), B (HLB), C(Florisil), D(Tenax) e E(Cromosorb).....	Erro! Indicador não definido.
Figura 11 Cromatograma obtido aplicando o método de separação cromatográfico de Lisboa et al. (2013), onde não foi possível realizar a distinção dos picos dos hormônios, alquilfenóis e BPA.	46
Figura 12 Cromatograma em FLD para os hormônios e alquilfenóis obtidos após mudanças na programação de eluentes.	47
Figura 13 Aplicação da separação cromatográfica dos Ftalatos no UFLC-DAD-FLD seguindo metodologia de Souza (2015).....	48
Figura 14 Separação cromatográfica obtida utilizando a coluna Shim-pack XR- Phenyl (100 x 2.0 mm, 2.20 μ m)	48
Figura 15 Resultado final da separação cromatográfica realizada no UFLC-DAD-FLD	49
Figura 16 Cromatograma dos Ftalatos DMP(195), DEP(223), DBP(279), BBP(313), DEHP(391) e DnOP(391) na concentração 1 μ gL ⁻¹	50
Figura 17 Gráfico de Pareto obtido no Statistica 7.0 para o planejamento fatorial, onde os fatores tempo de dessorção, tempo de agitação, massa de adsorvente e a interação entre a massa de adsorvente e tempo de agitação apresentam efeitos significativos.	55
Figura 18 Avaliação do ajuste do modelo Valores observados vs Preditos, Ajuste 0,95273; R ² =0,98582; erro puro= 0,18033386.....	56
Figura 19 Diagrama e superfície de resposta resultante da otimização pela matriz de Doehlert, os pontos em branco representam cada experimento realizado, o gradiente de cor representa melhor resultado conforme a tonalidade em vermelho escurece e os valores estão apresentados de forma codificada.	59
Figura 20 Comparação dos cromatogramas: A) amostra fortificada onde foram adicionados 500ngL ⁻¹ dos hormônios, alquilfenóis, BPA e 5000ngL ⁻¹ dos ftalatos. B) amostra "branco", onde os únicos picos observados em azul (m/z 279) e rosa (m/z 205) podem ser devido a alguma impureza, que, no entanto, o tempo de retenção destas não interfere com o sinal dos analitos. C) injeção direta da mistura contendo os 14 padrões em metanol, na concentração 100 μ gL ⁻¹ dos hormônios, alquilfenóis, BPA e 1mgL ⁻¹ dos ftalatos.	62
Figura 21. Cromatograma de uma amostra de água mineral contaminada com BPA e DMP	70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Comparação da afinidade da ligação com receptores estrogênicos (RE_{α} e RE_{β}).	21
Tabela 2 Interferentes endócrinos e suas propriedades	27
Tabela 3 Problemas de saúde associados a contaminação por interferentes endócrinos.	28
Tabela 4 Trabalhos recentes encontrados na literatura	30
Tabela 5 Analitos e seus íons monitorados	43
Tabela 6 Segmentos e íons monitorados no modo SIM	50
Tabela 7 Segmentos e íons monitorados no modo SIM com os 14 analitos	51
Tabela 8 Resultados da comparação entre os tipos de adsorvente	52
Tabela 9 Resultados para mistura binária C18 e Cromosorb	53
Tabela 10 Planejamento fatorial $2K^{-1}$	54
Tabela 11 Design experimental da matriz de Doehlert aplicada para três fatores	57
Tabela 12 Valores otimizados para a extração através da matriz de Doehlert	58
Tabela 13. Comprovação dos resultados da otimização.	59
Tabela 14 Análise de variância (ANOVA, $p < 0,05$) do modelo matemático ajustado	60
Tabela 15 Dados obtidos da curva analítica	63
Tabela 16 Limites de detecção e quantificação	65
Tabela 17 Resultados dos testes de precisão intra e interdia	67
Tabela 18 Resultado do teste de recuperação	69
Tabela 19 Avaliação da presença dos IEs em água mineral expresso em ngL^{-1}	71

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

- 4*n*-NP: 4 *n*-nonilfenol
- 4*t*-OP: 4 *t*-octilfenol
- 4*n*-OP: 4 *n*-octilftalato
- ACN: Acetonitrila
- AP: Alquilfenol
- APE: Alquilfenol etoxilados
- BBP: Benzilbutilftalato
- BPA: Bisfenol A
- DAD: Detector de arranjo de diodos
- DBP: Dibutilftalato
- DEHP: *Di*-(2-etilexil) Ftalato
- DEP: Dietilftalato
- DES: Dietilestilbestrol
- DLLME: Microextração líquido-líquido dispersiva
- DMP: Dimetilftalato
- DnOP: *Di-n*-octilftalato
- DTT: Ditiotreitól
- ECs: Contaminantes emergentes
- ER_α: Receptor de estrogênio alfa
- ER_β: Receptor de estrogênio beta
- E1: Estrona
- E2: 17 β-estradiol
- E3: Estriol
- EE2: 17 α-etinilestradiol
- FLD: Detector de fluorescência
- HPLC: Cromatografia líquida de alta eficiência

IE: Interferente Endócrino

LC: Cromatografia líquida

LD: Limite de detecção

LQ: Limite de quantificação

MeOH: Metanol

NP: Nonilfenol

OP: Octilfenol

PTFE: Politetrafluoretileno

RSD: Desvio padrão relativo

UFLC: Cromatografia líquida ultrarrápida

UFLC-FLD-DAD: Cromatografia líquida ultrarrápida acoplada aos detectores de fluorescência e arranjo de diodos

UFLC-MS: Cromatografia líquida ultrarrápida acoplada a um espectrômetro de massas

UHPLC: Cromatografia líquida de ultra performance

WHO (*World Health Organization*): Organização Mundial da Saúde

SUMÁRIO

1. Introdução	11
2. Revisão bibliográfica	14
<i>IE em água potável e água mineral</i>	15
<i>Hormônios esteroidais</i>	18
<i>Bisfenol A</i>	19
<i>Alquilfenóis</i>	Erro! Indicador não definido.
<i>Ftalatos</i>	23
<i>Interferentes endócrinos: propriedades físico-químicas e mecanismos de ação</i>	26
<i>Técnicas analíticas empregadas na determinação de IE</i>	31
<i>Técnicas preparo de amostra e extração</i>	34
3. Objetivos.....	37
4. Parte experimental	38
<i>Aquisição de amostra</i>	39
<i>Procedimento de extração</i>	39
<i>Instrumentação</i>	42
<i>Obtenção das figuras de mérito</i>	43
<i>Controle de qualidade (QA/QC)</i>	44
<i>Planejamento de experimentos</i>	45
<i>Tratamento de dados</i>	45
5. Resultados e discussão	45
<i>Separação cromatográfica</i>	45
<i>Procedimento de extração</i>	51
<i>Validação</i>	60
<i>Aplicação em amostras reais</i>	69
7. Conclusão.....	72
8. Referências Bibliográficas	73

1. Introdução

Contextualização e relevância do tema

Atualmente se tem consciência que vem ocorrendo a diminuição da disponibilidade de água potável. Este recurso vem sendo influenciado devido às condições de seca, a produção crescente de efluentes e resíduos, a urbanização e o crescimento populacional. O aumento da população implica em maior produção de rejeitos domésticos, industriais, hospitalares e agrícolas, que, quando descartados de forma incorreta, são de grande impacto no meio ambiente. Estes efluentes podem conter uma mistura de compostos orgânicos, em nível traço, inclusive compostos com propriedades bioativas, que pode não ser completamente atenuada nos sistemas convencionais de tratamento de águas residuais, conseqüentemente acarretando mudanças na qualidade dos corpos d'água, afetando direta ou indiretamente toda a vida no planeta. Essas mudanças indesejadas na qualidade de água trazem consigo novos desafios ambientais e econômicos (Daniels *et al.*, 2018; Houtman, Broek, ten e Brouwer, 2018; Meffe e Bustamante, de, 2014; Trudeau e Tyler, 2007).

No ano de 2019, a Organização das Nações Unidas (ONU) publicou estimativas para a população mundial para os anos seguintes. Devido à perspectiva de crescimento, espera-se que a população mundial ultrapasse o patamar de 8,5 bilhões de habitantes em 2030 e 9,7 bilhões em 2050, um incremento total de 2 bilhões de indivíduos se comparado a estimativa de 7,7 bilhões de habitantes no ano de 2019. Entretanto estima-se que devido a fatores como decréscimo na fertilidade e aumento na taxa de mortalidade a população mundial estabilize em 9 bilhões de habitantes ao final do século. Assim, ainda seria necessário o equivalente a três planetas Terra para suprir com os recursos necessários para manter-se o estilo de vida da população mundial atual (Nations, 2019).

A cada dia, uma ampla variedade de poluentes (fármacos, produtos de cuidado pessoal, surfactantes, plastificantes, pesticidas, entre outros) é lançada ao meio ambiente a partir das atividades de diversos setores (domésticos, industriais, hospitalares e agrícolas) originados na prática humana. A descarga de águas residuais promove a entrada de diversas substâncias com propriedades estrogênicas nos corpos de água, capazes de comprometer o sistema reprodutivo das populações de espécies aquáticas. De acordo com o *The Endocrine Disruption Exchange* (TEDX) atualmente 1482 substâncias são conhecidas por apresentarem efeitos depreciativo ao sistema endócrino. No entanto, os seres humanos podem se contaminar com estas substâncias através do contato direto, ingestão ou consumo de animais presentes nestes ambientes, agravado

por causa da possibilidade de biomagnificação.(An *et al.*, 2018; Philip, Aravind e Aravindakumar, 2018; TEDX, 2018; Weber *et al.*, 2019).

Após a Segunda Guerra Mundial, a indústria de plásticos cresceu rapidamente, atingindo, a produção anual de 322 milhões de toneladas de polímeros no ano 2015 (Beckman, 2018), e esta produção continua a crescer. Em 2016, aproximadamente 485 bilhões de garrafas pet foram produzidas ao redor do mundo, e a estimativa de produção para 2021 é de 583.3 bilhões de garrafas (Garside, 2019). Atualmente a China é o maior produtor mundial de plástico, e no ano 2017 era responsável por 29,4% da produção mundial (Europe, 2018). Os produtos plásticos de uso cotidiano podem conter bisfenol A, ftalatos, alquilfenóis entre outros interferentes endócrinos que podem ser facilmente liberados no solo, na água e ou em alimentos, ocasionando riscos à saúde humana e de outras espécies animais (Rashtian, Chavkin e Merhi, 2019; Zheng *et al.*, 2019).

A China é um exemplo do reflexo negativo do impacto ambiental causado por ftalatos. Arelado ao recente desenvolvimento econômico e crescimento populacional, os chineses se tornaram um dos maiores fabricantes e consumidores dos ésteres de ácido ftálico. Por consequência, foram encontrados ftalatos e seus derivados em diversos compartimentos ambientais como na atmosfera em ng m^{-3} , na água superficial em $\mu\text{g L}^{-1}$ e no solo em mg kg^{-1} . Esta contaminação generalizada ocasionou uma grande difusão dos contaminantes emergentes devido à falta de informações acerca da ocorrência e riscos associados a presença destas substâncias, revelando a necessidade de maior monitoramento e destino adequado (GAO *et al.*, 2018; PATEL *et al.*, 2020; TAN *et al.*, 2018).

Por sua vez, despertou-se um interesse da comunidade científica por um grupo de substâncias químicas despejados no meio ambiente capazes de interferir no sistema endócrino dos seres humanos e de outros animais, afetando a saúde, reprodução e desenvolvimento. Conhecidos como interferentes endócrinos (IEs) ou disruptores endócrinos, estas substâncias podem agir como agonista ou antagonista dos receptores hormonais, interferindo na síntese, regulação, ação e ou metabolismo dos hormônios. Pertencente a este grupo estão plastificantes, pesticidas, inseticidas, produtos de cuidado pessoal, fármacos, produtos de limpeza, entre outros. Conceitualmente, os interferentes endócrinos são substâncias (naturais ou sintéticas) capazes de exercer efeito adverso no sistema endócrino dos humanos e outros animais, consequentemente, provocando efeitos nocivos à saúde do organismo vivo, de sua prole e/ou de uma população, através da sua influência no sistema endócrino. (Gogola, Hoffmann e Ptak, 2019; Ma e Yates, 2018; Rocha, B. A. *et al.*, 2019; Street *et al.*, 2018).

Os interferentes endócrinos por possuírem estruturas com propriedades similares aos hormônios naturais, são capazes de se ligar aos receptores hormonais e, neste processo, podem

transmitir informações falsas ou bloquear a atuação dos hormônios, saturando os receptores, e ocasionando um desequilíbrio das funções endócrinas (Andrea *et al.*, 2018).

O grande interesse nessas espécies se deve ao fato de estarem relacionadas a uma série de problemas de saúde e reprodução como puberdade precoce, feminização da população de espécies de animais, alterações na formação dos órgãos reprodutores, dentre outros. Foi demonstrado que a presença destes interferentes resultam na redução da fertilidade e aumento da progressão de algumas doenças (Chin *et al.*, 2019; Hashemipour *et al.*, 2018; Lindgren *et al.*, 2019; Rashtian, Chavkin e Merhi, 2019; Yang *et al.*, 2015; Zhou *et al.*, 2019).

O Bisfenol A (BPA) é classificado como um interferente endócrino amplamente utilizado como matéria prima na manufatura de produtos plásticos. Os polímeros que utilizam o BPA como monômero podem passar por um processo de hidrólise, liberando este composto (Pradhan *et al.*, 2020). Por sua vez, os ftalatos são compostos utilizados como aditivos e não se ligam quimicamente aos monômeros da matriz polimérica, portanto esses podem migrar do polímero plástico através do contato ou evaporar para a atmosfera (Luo *et al.*, 2018). Por fim, os alquilfenóis são utilizados como plastificantes, antioxidantes e foto-estabilizantes na produção de alguns plásticos e são capazes de migrar para os alimentos de forma similar aos ftalatos (Amiridou e Voutsas, 2011; Elisabet, 2019; Loyo-Rosales *et al.*, 2004).

Devido à necessidade em acessar a concentração destas espécies em níveis traço ($\mu\text{g L}^{-1}$ e ng L^{-1}) foi desenvolvido, neste presente trabalho, um dispositivo customizado para a extração dos IE baseado em microextração em fase sólida dispersiva (*dispersive micro-solid phase extraction- d- μ -SPE*). Esta técnica é uma miniaturização da extração em fase sólida (*solid phase extraction- SPE*) convencional, portanto utiliza microlitros de solvente orgânico para um único procedimento de extração e apresenta altos fatores de recuperação. Na d- μ -SPE o adsorvente é disperso na amostra, utilizando um agente dispersante, ao invés de estar imobilizado como no procedimento clássico, permitindo uma interação mais dinâmica entre o adsorvente e os analitos. Dessa forma, uma quantidade pequena de adsorvente (mg L^{-1} ou $\mu\text{g L}^{-1}$) é inserido e disperso na amostra para capturar os analitos em seus sítios adsorptivos, posteriormente o adsorvente é recuperado por filtração e os analitos são desorvidos em um solvente, onde serão analisados.

No presente trabalho, foi desenvolvido um método para determinação de IE potencialmente presentes em amostras de água, utilizando d- μ -SPE como técnica de extração e determinação por cromatografia líquida ultrarrápida acoplada a espectrometria de massas (*Ultra Fast Liquid Chromatography Mass Spectrometry- UFLC-MS*). Foram considerados os ftalatos (dimetilftalato, dietilftalato, di-n-butilftalato, butilbenzilftalato, di(2-etilhexil)ftalato e di-n-octil ftalato), os alquilfenóis (4-n-nonilfenol , 4-n-octilfenol, 4-t-octilfenol), os esteroides

(estrona , 17 β -estradiol, estriol, 17 α -etinilestradiol) e o bisfenol A. Ensaios foram realizados para a otimização de alguns dos parâmetros que podem afetar a eficiência de extração, como tipo de adsorvente, massa do adsorvente, tempo de agitação, tempo de dessorção, adição de sal. O método foi validado e aplicado para a determinação dos IE em água mineral.

2. Revisão bibliográfica

Existe um esforço contínuo até os tempos atuais, principalmente entre a União Europeia (EU), os Estados Unidos da América (EUA) e a China, no que diz respeito à regulação de espécies classificadas como interferentes endócrinos. É relatada a existência de dificuldades na identificação dos efeitos causados por estas espécies, bem como em determinar a sua concentração (Bach *et al.*, 2012; Chormey *et al.*, 2017; Fan *et al.*, 2020). Estes se encontram presentes em uma grande variedade de produtos de uso cotidiano, tais como em bebidas, alimentos, roupas, plásticos, papeis, xampus, sabonetes, cremes dentais, fertilizantes, pesticidas, cosméticos, utensílios domésticos, brinquedos infantis, desodorantes, dentre outros (Day *et al.*, 2018).

O sistema endócrino, ou sistema hormonal, é componente essencial para grande parte dos animais como mamíferos, aves e peixes, sendo composto por hormônios, glândulas e receptores. A função dos hormônios é regular os processos biológicos, sendo capazes de desempenhar seu papel mesmo quando presentes em baixas concentrações. Os hormônios, como testosterona e estradiol são responsáveis pela diferenciação, crescimento e função dos órgãos reprodutores. Em suma, os estrogênios formam um grupo de hormônios relacionados ao desenvolvimento das características femininas, enquanto os andrógenos são responsáveis pelas características sexuais masculinas. (ESTADOS UNIDOS, 2017).

Em 1998, uma pesquisa afirmou (Sumpter, 1998) a existência inequívoca de espécies químicas presentes no ambiente aquático com potencial de alterar o funcionamento do sistema endócrino. Desde então estas substâncias capazes de mimetizar hormônios endógenos foram estudadas, de acordo com sua capacidade em alterar as características sexuais de diversas espécies de animais. Devido à estrutura química algumas destas substâncias podem biomagnificar ao longo da cadeia trófica, sendo acumulado no tecido adiposo, atingindo assim indiretamente animais maiores com mais intensidade (Sumpter, 1998).

Na natureza é possível encontrar o reflexo do efeito da exposição de certos interferentes endócrinos. Alguns dos efeitos registrados na literatura são: desenvolvimento anormal de ovário em embriões machos de aves marinhas e feminização das espécies adultas expostas ao diclorodifeniltricloroetano (DDT), resultando no decréscimo da população dessas aves no sul

da Califórnia (Fry e Toone, 1981); a mortalidade dos embriões, anormalidades no desenvolvimento e mortalidade ou redução da fertilidade de aves expostas a pesticidas e poluentes industriais (Fry, 1995; Halldin, 2005); alterações no fenótipo de jacarés; redução do tamanho do pênis e da concentração de testosterona no plasma em machos no lago Apopka (Guillette *et al.*, 1996); mudanças nas características sexuais de peixes; presença de órgãos masculinos nas fêmeas e feminino nos machos, caracterizando a intersexualidade em espécies de peixes expostas a estrogênio e alquilfenóis, reduzindo a capacidade de reprodução desses indivíduos (Tyler e Routledge, 1998) entre outros trabalhos.

É considerado também que plantas possam sofrer os efeitos ocasionados pela presença de interferentes endócrinos. Segundo Kim *et al.* (2018), os efeitos da exposição ao bisfenol A como contaminante no desenvolvimento da planta *Vigna Radiata* (uma espécie de feijão) afeta de diversas formas o crescimento e a capacidade de realizar fotossíntese. É possível que outros interferentes endócrinos possuam capacidade similar e também possam prejudicar outras espécies de plantas (Kim, Kwak e An, 2018).

A exposição a interferentes endócrinos também pode afetar o ser humano de formas diferentes, dependente do gênero. Relatos surgem a partir de 1970, quando médicos prescreveram erroneamente dietilestilbestrol (DES) para aproximadamente cinco milhões de gestantes, com o objetivo de prevenir o aborto espontâneo e promover crescimento dos fetos. Entretanto, após anos foi descoberto que as crianças geradas neste processo sofreram consequências no sistema reprodutivo e passaram a desenvolver câncer vaginal após atingir a puberdade (Rosenberg, 2018).

IE em água potável e água mineral

É constatado que para manter-se saudável, o corpo humano necessita de uma ingestão diária de água entre 1,5 - 2,5 L a depender da faixa etária, massa corporal, rotina de atividades físicas, dentre outras questões. Todavia, dentre as fontes disponíveis de acesso a água potável, não existe controle de qualidade a respeito de diversas substâncias, como os IEs, que não fazem parte das legislações estabelecidas e conseqüentemente não estão inclusas dentre os parâmetros usados para caracterizar se uma fonte de água é adequada para o consumo humano (Capdeville e Budzinski, 2011; Quattrini, 2016).

O consumo a longo prazo de água contendo IEs é um risco a saúde pública que pode ser evitado. No setor urbano, as duas principais fontes de consumo de água são: a água tratada (distribuída por serviços de saneamento básico) e a “água mineral” (comercializada por distribuidoras em garrafas de diferentes materiais e volume). Existem controvérsias acerca da

relação custo benefício destas fontes, ao redor do mundo. A água canalizada é sem dúvida a alternativa mais acessível e geralmente apresenta condições de consumo comparáveis à água mineral. Entretanto, estes dados devem ser observados em cada região, pois existem países com sistema de tratamento de água mais eficiente que garantem a qualidade da água distribuída e outros onde poucos processos são necessários. Por outro lado, a água mineral ,comercializada em embalagens plásticas, pode conter substâncias tóxicas que migram do plástico para o conteúdo da garrafa, tornando seu consumo impróprio (Diduch, 2011; Garfí *et al.*, 2016; Maggioni *et al.*, 2013; Meffe e Bustamante, de, 2014; Simazaki *et al.*, 2015; Valcárcel *et al.*, 2018).

A contaminação por essas espécies pode atingir os corpos de água por diversas vias. Ocorrendo diretamente na fonte em rios, lagos ou até em água subterrânea a partir do escoamento dos sistemas de água e esgoto, com o uso de produtos químicos aplicados na agricultura, pecuária e/ou indústria, comprometendo essas fontes. Por outro lado, a contaminação também pode acontecer durante o processo até chegar ao consumidor, através das tubulações no sistema de distribuição de água e ou em contato com as embalagens onde são comercializadas (Huang *et al.*, 2019; Jurado *et al.*, 2012; Lamastra, Balderacchi e Trevisan, 2016).

A respeito da água mineral, existe uma preocupação extra, pois além da contaminação ambiental ocorrida na fonte de água, é possível que alguns compostos sejam adicionados de forma não intencional (NIAS) a partir do transporte e armazenamento relatado diversas vezes na literatura (Bach *et al.*, 2012; Cincotta *et al.*, 2018; Jeddi *et al.*, 2016; Salazar-Beltrán *et al.*, 2017; Zaki e Shoeib, 2018). O tereftalato de polietileno (PET) é de longe o polímero mais utilizado na fabricação de embalagens para comercializar água. Entretanto, outros polímeros também são utilizados em menor escala para o mesmo fim, como por exemplo, polietileno (PE), polipropileno (PP), poliestireno (OS) e o cloreto de polivinila (PVC). O polímero PET por si só é uma substância inócua à saúde humana, entretanto em sua produção, bem como de outros polímeros, são adicionadas diversas substâncias plastificantes, como alquilfenóis, ftalatos e BPA, objetivando obter melhorias nas propriedades físicas e químicas. Estas substâncias podem migrar para os alimentos/bebidas a partir do contato direto, causando efeitos adversos à saúde de quem os utiliza (Diduch, 2011; Groh *et al.*, 2019).

O consumo de água mineral (embaladas em garrafas plásticas) tem crescido no mundo inteiro durante as últimas décadas. Observou-se um crescimento com grandes proporções no consumo nesse ramo, um valor aproximado de 315 % quando comparado as vendas dentre o período de 1999 e 2012. Além disso, acredita-se que a estimativa de receita gerada atualmente seja ainda maior (Orset, Barret e Lemaire, 2017; Ronquest-Ross, Vink e Sigge, 2015). A

produção anual global de plásticos, em 2015, atingiu a meta de 380 milhões de toneladas, sendo a maior parte desse material empregado no ramo de alimentos (Groh *et al.*, 2019). Acredita-se que na presente taxa de crescimento esta produção deve duplicar em 20 anos e triplicar até 2060 (Lebreton e Andrady, 2019).

Em termos de resíduos, estima-se que o mercado mundial de gerenciamento de resíduos plásticos tenha movimentado cerca de 32,6 bilhões de dólares em 2019. A projeção de crescimento até 2024 passando a 37,9 bilhões (“Plastic Waste Management Market”, 2019). Dos aproximadamente 6,3 bilhões de toneladas de plásticos produzidos até os dias atuais, apenas cerca de 9% é reutilizado enquanto a fração restante é incinerada ou despejada no meio ambiente (Forrest *et al.*, 2019).

O vidro também é utilizado como matéria prima para garrafas de água e alguns tipos de bebidas como sucos, cervejas e vinhos. Todavia no mercado de água mineral a garrafa de vidro torna o produto mais caro. Aparentemente, por este motivo estas são vendidas em menor quantidade (Szendi *et al.*, 2018). As concentrações dos IEs encontradas em água comercializada em garrafas de vidro são geralmente menores. As concentrações de ftalatos podem ser até 20 vezes maiores em garrafas PET se comparado com garrafas de vidros. O mesmo acontece com o BPA em diferentes países, um indicativo de que os problemas na contaminação por IEs podem estar ocorrendo no processo de produção e não apenas no material utilizado para confeccionar as embalagens (Aneck-Hahn *et al.*, 2018; P. Montuori *et al.*, 2008).

Recentemente Cincotta *et al.* (2017), afirmou que alguns IEs são adicionados de forma não intencional à água mineral engarrafada em recipiente de PET e atribuiu a causa não apenas ao material da embalagem, mas também à tampa, às etiquetas e a outros componentes da embalagem. Por sua vez, Beltrán *et al.* (2017) confirma a relação entre a presença desses contaminantes com a matéria prima utilizada nas embalagens, as condições durante o processo de produção e o armazenamento, confirmados em estudos de simulação com condições adversas de estocagem, onde uma porção de 5g de material plástico de uma garrafa foi adicionado em um recipiente de vidro de 50 mL e foi mantido durante 10 dias em um banho termostático a 40 °C (Cincotta *et al.*, 2018; Salazar-Beltrán *et al.*, 2017).

Diferentes alternativas de se avaliar o processo de migração, dos ECs para as embalagens, foram encontradas na literatura. Esses procedimentos variam em termos de período de incubação, temperatura e exposição ao sol (Bach *et al.*, 2014; Rastkari *et al.*, 2018). Cooper *et al.* (2011) investigaram a contaminação por migração de BPA para diferentes garrafas de água de diferentes materiais (plástico, vidro, alumínio entre outros) e confirmaram ter detectado acréscimo de 0,234 ng mL⁻¹ de BPA após 5 dias de incubação em garrafas plásticas à temperatura ambiente. Além disto, afirmam haver maior taxa de migração em maiores

temperaturas. Todavia, Jeddi et al. (2016) realizaram testes estabelecendo o período de incubação de 45 dias, com temperatura variando entre -18° C a 40° C, relatando que o armazenamento sob refrigeração não teve resultados significantes no aumento da concentração de ftalatos durante este período. Entretanto concluiu que os maiores valores de concentração foram observados a 40° C (Cooper, Kendig e Belcher, 2012; Jeddi *et al.*, 2016).

Hormônios esteroidais

Os hormônios naturais são substâncias geradas por glândulas que estão dispersas pelo corpo humano ou de mamíferos, peixes, pássaros e outros animais, posteriormente secretas para fluidos e corrente sanguínea, onde são dispersadas. Estas espécies agem como transmissores de informação entre as diversas partes do corpo, onde apenas se comunicam com as células que detêm o receptor adequado para receber a informação. Os hormônios estrona (E1), estradiol (E2) e estriol (E3) juntos formam o conjunto dos principais hormônios esteroidais femininos, produzidos no ovário, e também podem ser encontrados nos testículos em menor quantidade. Sendo assim, sua presença no meio ambiente está atrelada aos descartes humanos. No entanto, o 17 α -etinilestradiol (EE2) é um composto sintético utilizado como componente nas pílulas anticoncepcionais. Graças à popularidade desta substância no mercado farmacêutico, é possível atualmente encontrá-lo em ambientes aquáticos, atuando como interferente endócrino e afetando o equilíbrio e biodiversidade desses sistemas e a saúde humana (Melo *et al.*, 2017).

Estruturalmente, os hormônios esteroidais possuem o “esqueleto” do ciclopenta[α]fenantreno, uma estrutura genérica tetracíclica, sendo três anéis cicloexano e um ciclopentano (figura 1). Entretanto, nos esteroides E1, E2, E3 e EE2, o primeiro anel (contando da esquerda para direita) nominado como “A” é na realidade um anel aromático com uma hidroxila ligado ao carbono 3, podendo haver também substituições nos hidrogênios ligados aos carbono 16 e 17 por grupos funcionais (Moss *et al.*, 1989).

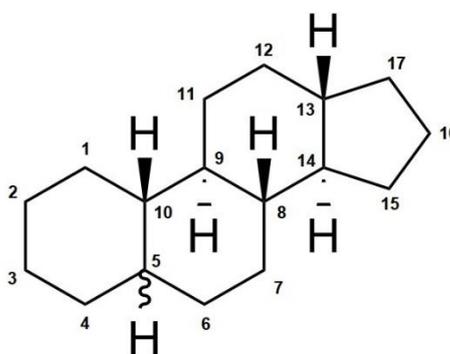


Figura 1-Estrutura molecular do ciclopenta[α]fenantreno.

A estrona possui um átomo de oxigênio ligado ao carbono 17 por uma dupla ligação (carbonila). O 17 β -estradiol possui uma hidroxila ligada ao carbono 17 que difere do 17 α -estradiol apenas pelo arranjo tridimensional. Já o estriol possui três grupos “OH” ligadas aos carbonos 3, 16 e 17. O 17 α -etinilestradiol (EE2) difere do E2 por uma R (-C \equiv CH) ligado ao carbono 17. Suas estruturas são representadas na Figura 2.

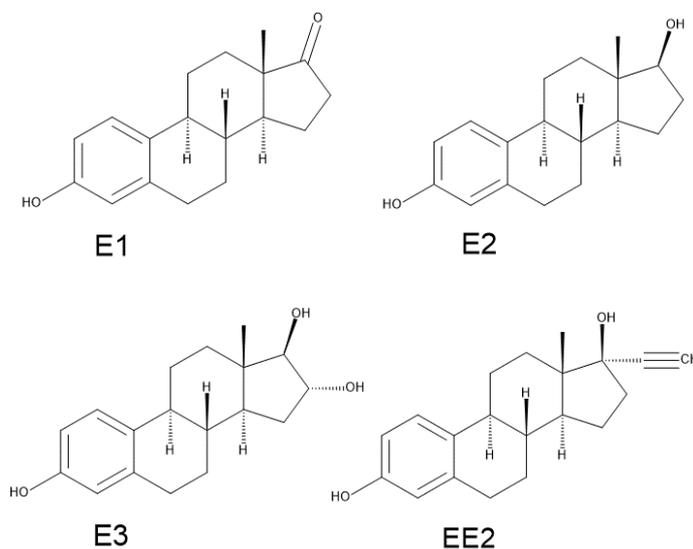


Figura 2 Estrutura molecular dos Hormônios naturais Estrona (E1) , 17 β -estradiol (E2), Estriol (E3) e sintético 17 α -etinilestradiol (EE2)

Estes compostos naturais (E1, E2, E3) ou sintéticos (EE2) são capazes de interagir com receptores de estrogênio, podendo assim interferir em diversos sistemas biológicos, atuando na síntese dos hormônios naturais, secreção, transporte, ação, competindo ou eliminando. Dessa forma, estas substâncias podem ocasionar danos aos seres vivos, a partir do desequilíbrio biológico promovendo um hormônio de forma exagerada, inibindo ou bloqueando seu efeito no sistema endócrino (Pamplona-Silva *et al.*, 2018).

Bisfenol A

O bisfenol A, 2,2-bis(4-hidroxilfenil)propano ou BPA é uma substância sintética cuja fórmula molecular é (CH₃)₂C(C₆H₄OH)₂, demonstrado na figura 3, e é classificada como um interferente endócrino, conhecido por ser amplamente utilizado na indústria desde 1950 como componente para a manufatura de produtos plásticos, resinas, garrafas plásticas, celulares, notebooks, recipientes para alimentos, equipamentos hospitalares, dentre outros. Em 2011, a produção anual mundial de BPA era estimada em três milhões de toneladas, em termos de

produção supera todos os ftalatos juntos (Deblonde, Cossu-Leguille e Hartemann, 2011; Oehlmann, Oetken e Schulte-Oehlmann, 2008). Adicionalmente, as projeções futuras de produção atual de BPA são estimadas em aproximadamente 7,3 milhões de toneladas no ano 2023, com uma taxa de crescimento de cerca de 3 % ao ano dentre o período de 2017 e 2023 (Markets, 2018).

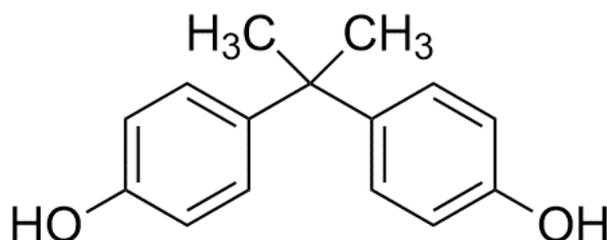


Figura 3: Estrutura molecular do Bisfenol A $(CH_3)_2C(C_6H_4OH)_2$.

A maior rota de exposição ao BPA está atrelada à dieta com o consumo de água e entre outros alimentos contaminados (Cichna-Markl, 2012). Mesmo quando ingerido em doses pequenas, a contaminação por esta substância está associada a vários problemas de saúde, como diversos tipos de cânceres (inclusive de próstata), obesidade, diabetes e problemas de reprodução, doenças cardiovasculares, doença renal crônica, asma, dentre outras (Liu *et al.*, 2019; Shafei *et al.*, 2018; Tudurí *et al.*, 2018; Vogel, 2009; Wright e Kelly, 2017). Tanto os ftalatos quanto o BPA foram relatados na literatura por apresentarem efeitos depreciativos à saúde do sistema reprodutivo masculino, como um decréscimo significativo na qualidade do sêmen que pode ocasionar infertilidade. As fases pré e neonatal vêm sendo apontadas como as fases nas quais os indivíduos estão mais vulneráveis à exposição, devido a formação do sistema reprodutor (Dabeer *et al.*, 2020; Rehman *et al.*, 2018).

A principal causa dos efeitos negativos em nível celular está associada à sua capacidade de interagir com os receptores de estrogênio α e β , alterando sua atividade fisiológica ou agindo contra a testosterona (Vagi *et al.*, 2014). Em termos de competição por estes receptores estrogênicos (RE), o BPA possui afinidade cerca de dez mil vezes menor que 17- β -estradiol. Contudo, a afinidade do BPA pelos RE α e RE β supera a testosterona, o que justifica o risco a exposição ocorrer principalmente em indivíduos do sexo masculino. A tabela 1 apresenta os valores de afinidade do 17- β -estradiol, Bisfenol A, 4-*t*, octilfenol, 4-*n*-octilfenol, nonilfenol e testosterona, pela ligação com os receptores estrogênicos α e β , onde o valor de afinidade do 17- β -estradiol foi arbitrariamente adotado como 100 e os demais medidos de forma comparativa, é possível observar que dentre estas substâncias citadas a testosterona apresentam o menor valor afinidade com os receptores α e β (Kuiper *et al.*, 2017).

Tabela 1: Comparação da afinidade da ligação com receptores estrogênicos (RE α e RE β).

Composto	RE α	RE β
17- β -estradiol	1	1
Bisfenol A	1x10 ⁻⁴	1x10 ⁻⁴
4-t-octilfenol	1x10 ⁻⁴	3x10 ⁻⁴
4-n-Octilfenol	2x10 ⁻⁴	7x10 ⁻⁴
Nonilfenol	5x10 ⁻⁴	9x10 ⁻⁴
Testosterona	<1x10 ⁻⁴	<1x10 ⁻⁴

*Tabela adaptada de (Kuiper *et al.*, 2017) , competição por afinidade dos receptores de estrogênio.

Com relação às diretrizes que sugerem limite diário de ingestão para o BPA, foram feitas grandes mudanças nos últimos dez anos: em 2008 a organização americana *Food and Drug Administration* (FDA) relatou não haver efeito adverso caso ingerido abaixo do limite diário de 5000 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de massa corporal. Entretanto, dois anos depois a *United States Environmental Protection Agency* (USEPA) delimitou o limite diário em 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$, uma redução em cem vezes, alertando que o mesmo teria o maior potencial em alterar o sistema hormonal. Atualmente, em 2018, as agências reguladoras alimentares da União Europeia reduziram a tolerância para o limite de exposição diária para 4 $\mu\text{g kg}^{-1}$, o que sugere que o risco ainda era maior do que se esperava, quando pesquisas recentes apontam possível alteração na transcrição de genes, entre outros efeitos adversos (Cichna-Markl, 2012; Ocharoen *et al.*, 2018).

Atualmente, é concebida a possibilidade de algumas doenças comuns como obesidade, doenças cardiovasculares, doença renal crônica, asma e câncer também estejam ligadas à exposição ao BPA. Estas doenças são ocasionadas pela interação do BPA com outros receptores e glândulas do sistema endócrino (González-Rojo *et al.*, 2019; Rezg *et al.*, 2014). A exposição a durante a infância pode resultar em efeitos adversos permanentes na vida adulta aumentando os riscos de desenvolvimento de doenças crônicas como a diabetes, uma vez que o BPA pode afetar o metabolismo da glicose, e a resistência à insulina (Tudurí *et al.*, 2018).

Alquilfenóis

Alquilfenóis (AFs) são substâncias sintéticas despejadas na natureza como resultado da degradação de surfactantes não-iônicos como o alquilfenol polietoxilato (pelo setor industrial) ou a partir de polímeros de uso doméstico. Dentre as diversas aplicações na agricultura,

industrias e uso doméstico, é de maior interesse neste trabalho avaliar o resultado da aplicação como plastificantes em polímeros como tereftalato de polietileno (PET), polietileno de alta densidade (PEAD) e cloreto de polivinila (PVC), pois nestes polímeros os AFs são aplicados como aditivos no processo de manufatura, com o intuito de se obter melhores propriedades físicas e químicas. Em outro cenário, as indústrias têxteis, de papel e agrícolas utilizam os alquilfenóis visando outros objetivos, em tintas, pesticidas, herbicidas, emulsificantes, dispersantes, agente floculante e antioxidante (Barber *et al.*, 2015; Günther, Räcker e Böhme, 2017; Salgueiro-González *et al.*, 2012).

Estruturalmente, os alquilfenóis são formados por um anel fenólico substituído com uma cadeia alquila que varia de 1 a 12 carbonos. Nesses compostos as posições dos grupos substituintes “orto”, “meta” e “para” são nominalmente simplificadas respectivamente em 2-, 3-, 4-alquilfenol. Dentre os subgrupos, o 4-octilfenol e 4-nonilfenol (figura 4) são os de maior interesse na área ambiental, devido ao maior emprego nas indústrias, uso doméstico e por serem considerados os metabólitos mais significativo e perigosos (Acir e Guenther, 2018; Salgueiro-González *et al.*, 2017).

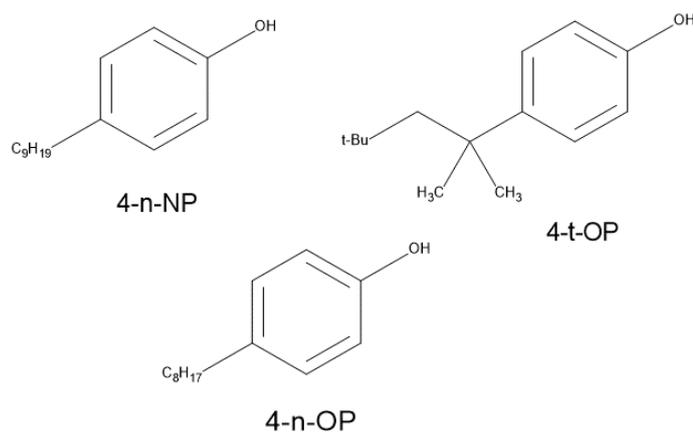


Figura 4. Estrutura molecular dos Alquilfenóis 4-t-Octilfenol (4-t-OP), 4-n-Octilfenol (4-n-OP), 4-n-Nonilfenol (4-n-NP).

Os efeitos deletérios associados à exposição a alquilfenóis e seus metabólitos são similares ao BPA. Estes foram identificados primeiramente por Soto *et al.* (1991) que os descreveram como sendo uma substância estrogênica liberada do plástico. Dentre o grupo dos alquilfenóis, as propriedades estrogênicas do nonilfenol é o que vêm chamando mais atenção por seu potencial nocivo em se ligar aos receptores e causar desequilíbrio no sistema endócrino (Soto *et al.*, 1991).

O nonilfenol, mesmo em baixas concentrações (100 nM), consegue provocar efeitos negativos nos genes relacionados ao sistema reprodutivo. Sua capacidade em se ligar ao

receptor ER_{α} foi confirmada por Amaro et al. no ano 2014 (Amaro *et al.*, 2014). Em 2017, Kuiper et al. afirmaram que os alquilfenóis podem competir com o E2 por ambos os receptores estrogênicos (ER_{α} e ER_{β}) praticamente na mesma intensidade, e descreveram também a intensidade da capacidade de interagir com os receptores, de acordo com a ordem decrescente de afinidade: nonilfenol, 4-*n*-octilfenol, 4-*t*-octifenol (tabela 5). Provavelmente, a afinidade por esses receptores cresce à medida que o número de carbonos do grupo alquila aumenta podendo atingir um valor até relativamente mil vezes menor que o 17β -estradiol (Kuiper *et al.*, 2017).

Outro aspecto relevante a respeito do nonilfenol é que este representa um grupo de isômeros com atividade estrogênica diversificada. Logo, a concentração total desses isômeros pode não refletir diretamente no potencial toxicológico, exigindo futuros estudos a respeito (Günther, Räcker e Böhme, 2017).

Ftalatos

Ftalatos, derivados di-ésteres do ácido ftálico, são compostos químicos sintéticos conhecidos há mais de cinco décadas. Dentre as formas de uso mais comuns, os ftalatos são utilizados em polímeros plásticos para favorecer a flexibilidade e resistência mecânica. Estes também são incorporados a cosméticos como agente fixador para aumentar a penetração de certos produtos na pele, ou então utilizados em esmaltes para prevenir quebra nas unhas. Discriminando a utilização, o dietilftalato (DEP) e di-*n*-butilftalato (DBP) são mais encontrados em produtos de cuidado pessoal, fármacos, solventes e adesivos, enquanto di(2-etilhexil)ftalato (DEHP) é o mais utilizado dentre os ftalatos, sendo aplicado como plastificante mais utilizado no mundo (Teodosiu *et al.*, 2018; Weizhen *et al.*, 2020).

Dentre os ftalatos, seis deles têm atraído atenção devido ao seu potencial nocivo. São estes: DMP, DEP, DBP, DnOP, BBP e DEHP, a estrutura molecular destes encontra-se ilustradas nas figuras 5 e 6 (Xu *et al.*, 2016). O DEHP, $C_6H_4(C_8H_{17}COO)_2$, é o ftalato que é geralmente encontrado em maior quantidade no meio ambiente e é de fato o mais amplamente produzido ao redor do mundo: cerca de três bilhões de quilogramas por ano, sendo principalmente aplicado na manufatura de policloreto de vinila (PVC) (Yang *et al.*, 2015).

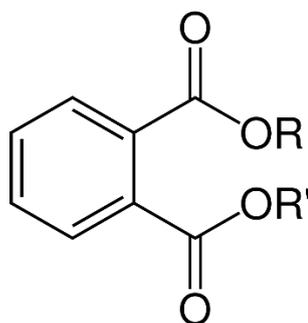


Figura 5: Estrutura genérica dos ftalatos

As fontes de exposição por ftalatos estão no consumo de água contaminada, alimentos, ingestão de partículas de solo ou poeira, contato com a pele ou inalação. Um estudo realizado na China, com 125 pessoas, mostrou que 33 delas apresentavam concentrações de ftalatos ou seus respectivos metabólitos acima do valor estabelecido como fator de risco devido ao consumo de água imprópria de 10 e 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ peso corporal/dia para os respectivos ftalatos DBP e DEHP. A maior parte dos integrantes do grupo de risco ingeria apenas água da torneira fervida, dando indícios de que a fervura da água não elimina estas espécies, que podem estar presentes na água distribuída a partir das estações de tratamento (Li *et al.*, 2019).

Outro fato importante é que os ftalatos não são quimicamente ligados à matriz dos polímeros em que são empregados. Logo é possível que ocorra migração por contato direto para um alimento ou objetos *e.g.* a transmissão através do material da garrafa plástica para a água mineral engarrafada ou, em outro exemplo, é a água tratada que foi contaminada ao percorrer as tubulações até chegar à torneira (Sun *et al.*, 2013).

Um indivíduo exposto à contaminação por ftalatos pode sofrer efeitos decorrentes da presença destas substâncias e de metabólitos, seus respectivos monoésteres. Quando presente no corpo humano, os ftalatos são rapidamente metabolizados aos seus respectivos monoésteres (a partir do processo de hidrólise) (Xu *et al.*, 2016). Em ftalatos que possuem cadeia alquila curta, os principais produtos metabólicos originados são os respectivos seus monoésteres, que são eliminados do corpo humano em algumas horas e são excretados pelas fezes ou urina (Schechter *et al.*, 2013).

Ftalatos e seus metabólitos podem agir no sistema endócrino das seguintes formas: elevando os efeitos fisiológicos do estrogênio, competindo por receptores com hormônios ou inibindo seus efeitos, por último alterando a biodisponibilidade desses hormônios (Pamplona-Silva *et al.*, 2018).

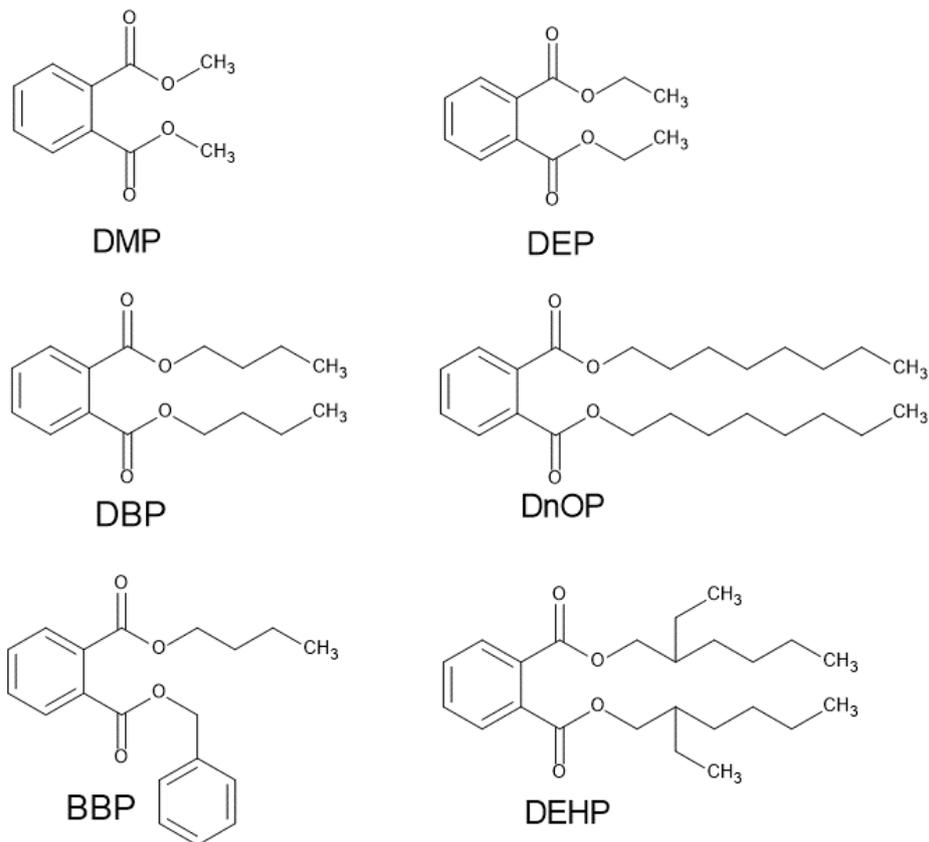


Figura 6 : Estrutura molecular dos ftalatos Dimetilftalato(DMP), Dietilftalato (DEP), Dibutilftalato (DBP), Di-n-octilftalato(DnOP), Butilbenzilftalato (BBP) e Di(2-etilhexil)ftalato (DEHP)

Em estudos recentes realizados para avaliar a puberdade precoce em garotas, um grupo de interferentes endócrinos classificados como ftalatos, foi avaliado e afirmou-se existir uma forte relação entre a exposição a esses compostos e a incidência da puberdade precoce, onde os níveis encontrados de di-(2-etilhexil)ftalato (DEHP) no plasma sanguíneo do grupo de mulheres que passaram pela puberdade precoce é significativamente mais alto, consequência do consumo de água, bebidas, sucos engarrafados, alimentos embalados, produtos cosméticos e contato com brinquedos plásticos durante a infância (Hashemipour *et al.*, 2018). Ao mesmo tempo, existe uma preocupação mundial relacionado ao sexo masculino, uma vez que pode haver ocorrência de anomalias ligadas à qualidade do sêmen (contagem de esperma) devido a pela exposição a ftalatos, afetando negativamente a saúde e reprodução (Rehman *et al.*, 2018; Zhu *et al.*, 2016).

Os principais efeitos negativos relacionados à contaminação por ftalatos estão ligados a problemas reprodutivos, oriundos do potencial dessas substâncias em causar anormalidades no funcionamento no sistema endócrino e receptores de esteroides. Dentre a variedade de possíveis efeitos prejudiciais à saúde Schecter *et al.* (2013) descreve relatos que o indivíduo do sexo

masculino pode desenvolver infertilidade por decréscimo da qualidade do esperma, por danos causados ao DNA e pela baixa contagem de esperma. Em indivíduos do sexo feminino pode provocar a puberdade prematura nas meninas e em bebês gerados por mulheres expostas a ftalatos podem nascer abaixo do peso dentre outros efeitos (Chen *et al.*, 2014; Lindgren *et al.*, 2019).

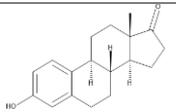
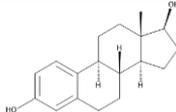
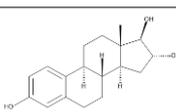
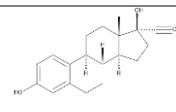
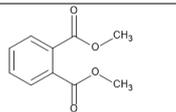
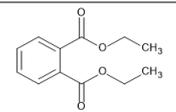
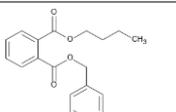
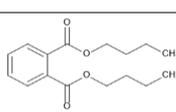
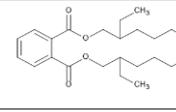
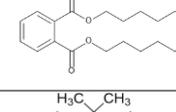
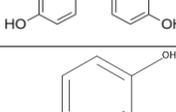
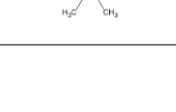
Interferentes endócrinos: propriedades físico-químicas e mecanismos de ação

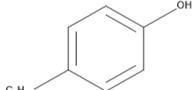
Os compostos estudados neste trabalho podem ser divididos em subgrupos de acordo com suas aplicações e origem. A tabela 2 apresenta as suas respectivas estruturas químicas e algumas de suas propriedades como solubilidade em água, coeficiente de partição octanol-água, constante de acidez, pontos de fusão e ebulição e a constante de Henry. Ao primeiro grupo pertencem a estrona (E1), o 17 β -estradiol (E2) e o estriol (E3), que são hormônios naturais produzidos pelo corpo humano e animais, complementando com o 17 α -etinilestradiol (EE2), um hormônio sintético, que possui similaridades com os hormônios femininos, e é muito utilizado em pílulas anticoncepcionais.

Do segundo grupo fazem parte o bisfenol A (BPA), o 4-*n*-nonilfenol (4-*n*-NP), o 4-*n*-octilfenol (4-*n*-OP), o 4-*t*-octilfenol (4-*t*-OP), formando o conjunto de alquilfenóis e BPA, utilizados em produtos industrializados como detergentes, tintas, propelentes em pesticidas, produtos de cuidado pessoal, plastificantes, elastômeros, acrílico e acetato de vinila. Em adicional, pertencentes ao terceiro grupo estão os ftalatos, o dimetilftalato (DMP), o dietilftalato (DEP), o butilbenzil ftalato (BBP), o di-*n*-butilftalato (DBP), o di(2-etilhexil) ftalato (DEHP) e o di-*n*-octil ftalato (DnOP), que possuem diversas aplicações como serem utilizados como plastificantes em polímeros, aditivos em inseticidas, tintas, cosméticos, coberturas de assoalho, forros, roupas ou isolantes em dispositivos elétricos, dentre outros (Chen *et al.*, 2014; Deblonde, Cossu-Leguille e Hartemann, 2011; Lamprea *et al.*, 2018; Yan *et al.*, 2018).

Em ambientes aquáticos, os contaminantes apresentam riscos potenciais aos ecossistemas, à biodiversidade e à disponibilidade de alimentos atingindo diversos pontos da cadeia alimentar, acarretando em efeito ainda maiores ao serem acumulados através dos níveis tróficos (Chae *et al.*, 2018).

Tabela 2 Interferentes endócrinos estudados e suas propriedades

Composto	Estrutura Química	Solubilidade em água mgL ⁻¹ (25°C)	LogKow	pKa	PF/PE(°c)	Constante de Henry (atm m ³ mol ⁻¹)
Estrona (E1)		30,0	3,13	10,2	154 /260,2	3,8X10 ⁻¹⁰
17β-estradiol (E2)		3,90 (27°C)	4,01	10,3	178,5 (PF)	3,6X10 ⁻¹¹
Estriol (E3)		27,3	2,45	10,5	282 (PF)	1,3X10 ⁻¹²
17α-etinilestradiol (EE2)		11,3 (27°C)	4,15	10,2	183(PF)	7,9X10 ⁻¹²
dimetilftalato (DMP)		4,00	1,60	-	284/5,5	2,0X10 ⁻⁷
dietilftalato (DEP)		1,08	2,47	-	295/-40,5	6,1X10 ⁻⁷
butilbenzilftalato (BBP)		2,69	4,73	-	370/-35	1,3X10 ⁻⁶
di-n-butilftalato (DBP)		11,2	4,50	-	340/-35	1,81X10 ⁻⁶
di(2-etilhexil)ftalato (DEHP)		0,270	7,60	-	385/-50°C	2,7X10 ⁻⁷
di-n-octilftalato (DnOP)		0,0220	8,10	-	220/25	2,6X10 ⁻⁶
Bisfenol A (BPA)		300	3,32	9,60	360.5 /160	4,0X10 ⁻¹¹
4-n-nonilfenol (4nNP)		7,00	5,76	-	317 /42	3,4X10 ⁻⁵
4-n-octilfenol (4nOP)		12,6*	4,12*	-	280/44	6,9x10 ⁻⁵

4-<i>t</i>-octilfenol (4OP)		5,11	5,25	-	279/84,5	6,9X10 ⁻⁶
--	---	------	------	---	----------	----------------------

Fonte: PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>), * Solubilidade a 20 °C e K_{ow}(Ying, Williams e Kookana, 2002)

A mudança de sexo e capacidade reprodutiva dos animais são apontados como características evidentes da contaminação por interferentes endócrinos, a tabela 3 apresenta a relação entre as substâncias estudadas e os riscos associados. Mesmo quando presente em baixas concentrações, na ordem de µg L⁻¹ ou ng L⁻¹, os interferentes endócrinos podem afetar processos fundamentais para o controle da reprodução e desenvolvimento de diversas espécies. Contudo, no desenvolvimento das etapas iniciais da vida (fetos, bebês, crianças ou equivalente em animais) é notada maior sensibilidade à presença dos interferentes endócrinos (Bosker, Santoro e Melvin, 2017; Niu e Zhang, 2018; Valcárcel *et al.*, 2018).

Atualmente a lista em vigor de candidatos a contaminantes (CCL) de água potável determinada pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA) reforça a necessidade existente de inclusão dessas substâncias nas legislações ambientais, para que possam ser tomadas medidas oficiais. Em 2016 uma atualização na lista de candidatos acrescenta a CCL-4 os seguintes contaminantes químicos: estrona (E1), 17-beta estradiol (E2), estriol (E3), 17-alfa etinil estradiol (EE2) e nonilfenol, reconhecendo os riscos em potencial causado por estas espécies (U.S. EPA, 2016).

Tabela 3 Problemas de saúde associados a contaminação por interferentes endócrinos

Compostos	Riscos associados	Indivíduos afetados	Referência
<i>Ftalatos</i>	Interfere na distância anogenital em fetos e feminilização de recém-nascidos;	Humanos e animais	(Lindgren <i>et al.</i> , 2019)
<i>Ftalatos</i>	Distúrbio metabólico lipídico, acidente vascular cerebral, aterosclerose, diabetes, doenças das artérias coronárias;	Humanos e animais	(Zhou <i>et al.</i> , 2019)
<i>Bisfenol A e Ftalato</i>	Alterações na composição e textura muscular;	Peixe (<i>Sparus aurata</i>)	(Carnevali <i>et al.</i> , 2019)
<i>Hormônios esteroides (naturais e sintéticos)</i>	Masculinização da população da espécie e características sexuais secundárias;	Peixe-mosquito (<i>Gambusia affini</i>)	(Huang <i>et al.</i> , 2019)

<i>Ftalatos</i>	e	Dificuldades na gestação e desenvolvimento do feto;	Humanos	(Chin <i>et al.</i> , 2019)
<i>Bisfenol A</i>				
<i>Bisfenol A</i>	e	Bioacumulador, riscos a quem consome;	Mexilhão verde (<i>Perna viridis</i>)	(Ocharoen <i>et al.</i> , 2018)
<i>Estradiol</i>				
<i>Ftalatos</i>		Puberdade precoce em meninas;	Humanos	(Hashemipour <i>et al.</i> , 2018)
<i>Ftalatos</i>	e	Anomalias no trato reprodutivo masculino e declínio na qualidade do sêmen;	Humanos	(Rehman <i>et al.</i> , 2018)
<i>Bisfenol A</i>				
<i>Alquilfenóis</i>		Problemas de desenvolvimento, reprodução, transcrição de genes e estresse oxidativo;	Microcrustáceo (<i>Daphnia magna</i>)	(Haeyoun e Lee, 2019)
<i>Alquilfenóis</i>		Feminilização e mudanças na população;	Peixes (<i>Barbus meridionalis</i> , <i>Squalius laietanus</i>);	(Blanco <i>et al.</i> , 2019)

Acredita-se que a maioria dos compostos não inclusos ou regulados pelas legislações de água potável bem como a diretriz para qualidade da água potável (WHO, 2011) e outras diretrizes ao redor do mundo são consequência da falta de informação acerca dos impactos, toxicidade, comportamento e refino dos métodos consolidados para determinação destas substâncias (Riva *et al.*, 2018; Teodosiu *et al.*, 2018). Desta forma, tornam-se relevantes os estudos direcionados a obter estas informações, possibilitando assim uma atualização dessas diretrizes com a inclusão dessas espécies, estabelecendo seus valores limites de exposição.

Por outro lado, existe um grande problema com relação ao suprimento de água, uma vez que os tratamentos convencionais (filtração, floculação e desinfecção) não são eficazes em lidar com estes micro contaminantes (Simazaki *et al.*, 2015). No entanto, procedimentos refinados para tratamento de água como processos oxidativos avançados (POA), adsorção com carbono ativado, aplicação de membranas e biodegradação por enzimas, têm se mostrado eficientes na remoção destes compostos. Entretanto, esses métodos alternativos elevam os custos do tratamento de água, limitando o acesso a este recurso (Bilal *et al.*, 2019; Teodosiu *et al.*, 2018). Logo, vem à tona a necessidade de estudos para implementação de novas estratégias de monitoramento, bem como a remoção destes compostos (Kim *et al.*, 2018; Wee e Aris, 2017; Yang *et al.*, 2017).

Tabela 4 Estudos recentes envolvendo a análise de interferentes endócrinos

Compostos	Tipo de amostra	Níveis encontrados	Local de amostragem	Método de preparo de amostras	Métodos de análise	Referência
<i>BPA</i>	Alimentos para bebês	1,1 ng g ⁻¹	Granada, Spain	Extração sólido líquido dispersiva	GC-MS/MS	(García-Córcoles <i>et al.</i> , 2018)
<i>DMP, DBP, DEP</i>	Garrafas pet	1,1 a 63 mg kg ⁻¹	Monterrey City, México	Extração assistida por micro-ondas (MAE)	HPLC-UV	(Salazar-beltrán <i>et al.</i> , 2018)
<i>BPA, E2</i>	Água de superfície	50,67 a 62,98 ng L ⁻¹	Golfo da Tailândia	Extração em fase sólida, cartuchos (C ₁₈)	HPLC-UV	(Ocharoen <i>et al.</i> , 2018)
<i>BPA, OP, NP</i>	Musculo de peixes	0,023 a 0,322 ng g ⁻¹	Pulau Kukup, Johor, Malásia	Extração em fase sólida cartucho de Phenomenex.®	HPLC-FLD	(Ismail, Wee e Aris, 2018)
<i>DMP, DEP, DBP, DEHP, DnOP, DINP, DIDP</i>	Água de superfície	0,065 a 2,465 ug L ⁻¹	Rio Songhua, China	Extração fase líquida	GC-MS	(Wen <i>et al.</i> , 2018)
<i>DMP, DEP, DBP, BBP, DEHP, DnOP</i>	Água residual	0,03 a 2488,31 µg L ⁻¹	Amathole Municipality, África do Sul	Extração fase sólida, cartuchos (C ₁₈)	GC-MS	(Salaudeen <i>et al.</i> , 2018)
<i>BPA, NP</i>	Água potável	15,17 a 355,89 ng L ⁻¹	Madri, Espanha	Pré-concentração líquido-líquido Online	LC-MS-MS	(Valcárcel <i>et al.</i> , 2018)
<i>E1, E2, E3, EE2</i>	Água potável e de superfície	<5,0, ng L ⁻¹	Curitiba, Brasil	Extração em fase sólida, cartuchos (C ₁₈)	HPLC-FLD	(Liz, De <i>et al.</i> , 2017)
<i>E1, E2, E3, EE2</i>	Água superfície e peixes	6,2 a 433,6 ng L ⁻¹	China, rio Lianhe	Extração sólido-líquido	GC-MS	(Huang <i>et al.</i> , 2019)
<i>DMP, DEP, DBP, BBP, DEHP, DnOP e outros</i>	Azeite d/e oliva	0,030 a 7520 mg kg ⁻¹	Diversos países Europeus	Extração líquido-líquido	GC-MS	(Pereira, Selbourne e Poças, 2019)
<i>DMP, DEP, DBP, BBP, DEHP, DnOP e outros</i>	Microplásticos	0,011 a 3,89 ng g ⁻¹	Mar amarelo, China	Extração sólido-líquido	GC-MS	(Zhang <i>et al.</i> , 2018)
<i>E1, E2, EE2</i>	Água de superfície	0,9 a 4,4 ng L ⁻¹	África do Sul	Extração fase sólida, cartuchos (C ₁₈)	LC-MS	(Mnguni <i>et al.</i> , 2018)
<i>BPA, E1, E2, EE2, ftalatos e alquilfenóis</i>	Água mineral (PET)	0,9 a 10,06 ng L ⁻¹	África do Sul	Extração fase sólida, cartucho Oasis HLB.	GC-MS/Yes	(Aneck-Hahn <i>et al.</i> , 2018)
<i>E2, EE2</i>	Água tratada e mineral	3,0 a 246 ng L ⁻¹	Jalisco, México	Extração fase sólida, cartucho C ₁₈	GC-MS	(Vallejo-Rodríguez <i>et al.</i> , 2017)

Os Interferentes endócrinos (IEs) podem ser encontrados em diversas matrizes e em diferentes condições ambientais como alimentos, água, solo, ou até acumulados em algumas espécies de animais e vegetais (Kim, Kwak e An, 2018; Nicole, 2016; Olukole *et al.*, 2018). Alguns exemplos de trabalhos encontrados na literatura atrelado a estas espécies bem como os níveis de concentração e metodologia utilizadas são citados na tabela 4, onde estes compostos foram encontrados em alimentos para bebês, garrafas pet, água superficial, água mineral, moluscos, peixes, água mineral e água tratada, evidenciando a ubiquidade destes compostos, os riscos à saúde devido a sua presença e as técnicas refinadas utilizadas para a determinação.

Pesquisas mostram que exposições mesmo em níveis baixos (ng L^{-1}) destes interferentes levam a mudanças permanentes no sistema endócrino nos seres humanos e animais, uma vez que tais substâncias podem atuar através do mimetismo, competição ou interrupção da síntese de hormônios endógenos. Isto resulta em reprodução prejudicada e consequente baixa taxa de natalidade, perda potencial de biodiversidade, disfunção metabólica e aumento da incidência e progressão de cânceres sensíveis a hormônios (Bókony *et al.*, 2018; Gallo *et al.*, 2018; Lejonklou *et al.*, 2017; Olukole *et al.*, 2018).

Em resumo, os hormônios esteroides, como o estriol, estrona e 17α -etinilestradiol bem como os alquilfenóis, BPA e ftalatos, interagem com receptores de estrogênio, podendo interferir em diversos sistemas, pois podem atuar na síntese, secreção, transporte, ligação ou eliminação dos hormônios naturais e, desta forma, ocasionam danos ao sistema biológico promovendo, inibindo ou bloqueando o sistema endócrino (Pamplona-Silva *et al.*, 2018). Por outro lado, dentre os alquilfenóis, o nonilfenol por exemplo, também pode afetar a expressão de genes envolvidos na via reprodutiva e em processos metabólicos ao ligar-se e atuar como agonista dos receptores de estrogênios (Amaro *et al.*, 2014). Todos estes compostos estão envolvidos em uma série de problemas fisiológicos crônicos associados a organismos terrestres, aquáticos (Rogers e Mirza, 2013; Wen *et al.*, 2018; Wright e Kelly, 2017) .

Técnicas analíticas empregadas na determinação de IE

A cromatografia gerou os principais instrumentos atualmente utilizados na determinação dos IEs. Os estudos em cromatografia surgiram no início do século XX e teve seu mérito atribuído ao botânico russo Mikhael Tswett, que foi capaz de separar pigmentos coloridos em extratos de plantas em um tubo preenchido com carbonato de cálcio. Desde então está técnica tem evoluído bastante, com o advento do uso de computadores para monitoramento

dos parâmetros experimentais e tratamento de dados bem como desenvolvimento de colunas de separação cada vez mais eficientes.

Esta técnica de separação promove a separação dos componentes de uma amostra entre duas fases, a fase estacionária fixa com uma grande área superficial e uma fase móvel fluida que percorre através do sistema. Os métodos cromatográficos mais sofisticados atualmente podem ser classificados de acordo com a natureza física da fase móvel, podendo ser um líquido, gás ou fluido supercrítico hifenado a um tipo de detector.

A cromatografia líquida se tornou uma técnica amplamente empregada nas últimas décadas. O desenvolvimento de novas partículas de fase estacionária permitiu gerar colunas de separação mais seletivas, eficientes e estáveis. A associação da técnica de separação com técnicas de análise utilizando detectores mais sofisticados, como detector de arranjo de diodos (DAD) e detector de fluorescência (FLD), e espectrômetro de massas (MS) foi um avanço em termos analíticos.

O detector de massas é provavelmente o detector mais versátil e importante para análise de compostos orgânicos em concentrações de nível traço. Entretanto a interface entre a cromatografia líquida, que opera em altas pressões, e o espectrômetro de massas, que opera no vácuo, exigiu o desenvolvimento de interfaces complexas tornando o equipamento menos acessível no entanto necessário em diversos procedimentos.

Os detectores baseados na absorção de luz, são os mais empregados em cromatografia líquida atualmente. A atenuação da intensidade do feixe de luz que atravessa uma cela contendo a amostra é o princípio básico dos detectores UV-VIS (opera nas regiões ultravioleta e visível). O detector de arranjo de fotodiodos (PDA), o mais aplicado detector UV-VIS neste seguimento, é um conjunto de diodos onde cada um destes monitora uma faixa estreita de comprimento de onda. Em conjunto, os dados obtidos pelo PDA permitem a obtenção do espectro completo, a partir de um software, onde podem ser identificados sinais que podem ser associados as espécies analito. A escolha do comprimento de onda mais sensível, relacionada às espécies a serem analisadas, permite um ganho em termos de sensibilidade. Em termos de custo, esta técnica é mais acessível em comparação com a espectrometria de massas.

O detector de fluorescência, tem como princípio a capacidade de alguns compostos em absorver a radiação eletromagnética, passando do estado fundamental a um estado excitado, e reemiti-la em um comprimento onda de menor energia ao retornar para o estado fundamental. Nem todos os compostos possuem esta característica tão evidente, a fluorescência é mais intensa em compostos que possuem ligações químicas mais rígidas, como anéis aromáticos ou compostos conjugados contendo várias duplas ligações. Logo, esta técnica é restrita em termos da natureza química dos analitos que podem ser utilizados, e ao mesmo tempo que permite um

ganho de seletividade, apresentando pouca ou nenhuma interferência. Em suma, este detector permite elevada sensibilidade e é comparativamente mais acessível que a espectrometria de massas, entretanto tem aplicação limitada a espécies de natureza fluorescente.

Devido às suas peculiaridades, na determinação dos IEs é necessária a utilização de técnicas cuja sensibilidade seja capaz de alcançar os baixos níveis de concentração nos quais estas espécies são encontradas no meio ambiente. A técnica mais comumente aplicada é a cromatografia acoplada à espectrometria de massas, devido à alta sensibilidade permitida pela técnica e facilidade em associação com técnicas de microextração. (Salgueiro-González *et al.*, 2017).

Dentre as técnicas cromatográficas empregadas, a cromatografia líquida (LC) e cromatografia gasosa (GC) apresentam vantagens e desvantagens entre si. Os cromatógrafos de fase gasosa levam esta denominação devido à fase móvel utilizada se encontrar na forma gasosa, geralmente um gás inerte a altas temperaturas. Apesar de sua alta eficiência, esta técnica se depara com uma limitação para aplicação em compostos com grande massa molecular e pouco estáveis frente a altas temperaturas (200 a 300°C) e com baixas pressões de vapor. Uma estratégia comumente aplicada para permitir trabalhar com compostos que sofrem estas limitações é a partir da derivatização química. Entretanto, a cromatografia líquida, onde geralmente a fase móvel se trata da combinação de dois eluentes e uma programação de mistura destes, permite a análise de compostos não voláteis, independente do peso molecular, contanto que seja uma espécie capaz de ser solubilizada em uma fase líquida. Em adicional, as faixas de temperatura nesses equipamentos variam da temperatura ambiente até 80°C, permitindo trabalhar com substâncias sensíveis a altas temperaturas e não necessitando de derivatização química (Mnguni *et al.*, 2018; Vallejo-Rodríguez *et al.*, 2017).

A cromatografia líquida (LC) utilizando o detector de fluorescência (FLD) e/ou de arranjo de diodos (DAD) é uma alternativa para detecção destes compostos. De fato, a sensibilidade destes detectores é inferior ao detector de massas, dificultando a aplicação para matrizes mais complexas e com concentrações mais baixas destes analitos. Entretanto, esta dificuldade pode ser superada graças ao procedimento de extração e ou *clean-up* aplicados no preparo de amostra. Outra questão relevante é que são atingidos menores limites de detecção por não necessitar da etapa de derivatização, se comparado à cromatografia gasosa. Instrumentos mais sofisticados para a cromatografia líquida podem ser acoplados ao detector de massas, entretanto o custo desse equipamento também é um fator limitante (Salgueiro-González *et al.*, 2017).

Neste presente trabalho aplicou-se a cromatografia líquida ultrarrápida com espectrômetro de massas (UFLC-MS), uma versão mais sofisticada do clássico HPLC, que a

grosso modo trabalha com altas pressões e tubulação mais fina, resultando no consumo muito menor de eluentes e redução dos resíduos, sendo assim considerada ambientalmente favorável. Além disso, outra vantagem deste instrumento é o ganho em frequência analítica, onde os tempos de retenção são geralmente mais baixos, ocasionando corridas até dez vezes mais rápidas e o ganho em sensibilidade devido ao detector de massas.

Determinar a concentração dos IEs em água mineral ou tratada parece ser uma tarefa relativamente simples: é de se esperar que essas matrizes possuam poucas espécies interferentes facilitando o trabalho. Entretanto, devido à necessidade de avaliar a presença dos IEs onde as concentrações são muito baixas, estando na ordem de μgL^{-1} ou até ngL^{-1} , se torna indispensável a aplicação de procedimentos de extração e pré-concentração destes analitos atrelado ao uso de instrumentação analítica refinada. As etapas de pré-concentração acabam exercendo grande influência na obtenção dos resultados buscando atingir melhores limites de detecção (Chevolleau *et al.*, 2016), as principais técnicas de preparo de amostra e análise para os IEs em matrizes aquosas serão discutidas a seguir.

Técnicas preparo de amostra e extração

O preparo de amostra é uma etapa crucial ao se trabalhar com matrizes aquosas, pois com este procedimento é possível separar os analitos dos outros componentes da matriz, permitindo isolar e/ou pré-concentrar estas espécies de modo a tornar suas análises possíveis mesmo quando os analitos se encontram em concentrações reduzidas do meio ambiente. É desejável que o volume de amostra necessário para realizar estas análises, bem como o consumo de solventes e outros reagentes, sejam cada vez menores, objetivando produzir menor quantidade de rejeitos e estar de acordo com os princípios da Química Verde (Ali *et al.*, 2019; Salgueiro-González *et al.*, 2017).

Existem diversas alternativas para extração/pré-concentração dos IEs a partir da matriz aquosa, dentre as mais utilizadas estão extração líquido-líquido (*liquid-liquid extraction*), extração em fase sólida (*solid-phase extraction*), micro extração em fase sólida (*solid-phase microextraction*), micro extração em fase sólida dispersiva (*dispersive solid-phase microextraction*), extrações assistidas por ultrassom ou não e suas derivações (Chormey *et al.*, 2017; García-Córcoles *et al.*, 2018; Ghorbani *et al.*, 2018).

Extração líquido-líquido: com pouca utilização atualmente, esta técnica requer grande consumo de reagentes tóxicos, como diclorometano ou clorofórmio, em média de 200 mL, grande volume de amostra (superior a 500 mL) e alto tempo de preparo. Contudo a microextração líquido-líquido vem substituindo o método clássico resolvendo a maioria dos

problemas associados a geração de resíduos desta técnica, utilizando apenas cerca de 200 µL de solvente e com menor tempo de preparo.

Neste tipo de extração a amostra é misturada com um solvente polar e outro solvente orgânico não polar, resultando na formação de um sistema com duas fases imiscíveis, objetivando que os analitos migrem para uma partição do solvente enquanto as impurezas migrem para o outro solvente (Muhammad, Ahad e Mehboob, 2020).

A extração líquido-líquido tem como princípio a preferência de afinidade dos analitos por uma das fases, e essa afinidade pode ser avaliada de forma genérica pelo coeficiente de partição octanol água (K_{ow}). Em adicional o controle do pH e/ou adição de sal pode melhorar os resultados, facilitando a difusão dos analitos para a fase de interesse (Diana e Dimitra, 2011; Salgueiro-González *et al.*, 2017).

Microextração líquido-líquido dispersiva: Técnica inovadora no campo da extração líquido-líquido, apresentando diversas vantagens e resultados promissores, dentre estas o baixo custo, simplicidade, maior frequência analítica, e melhores fatores de enriquecimento. Esta técnica se resume em extrair os analitos da fase aquosa a partir de uma mistura apropriada do solvente de extração e uma fase líquida dispersante. A mistura dos solventes forma uma solução turva e em seguida é centrifugada, formando duas fases; a fase superior é coletada e pode ser analisada em um cromatógrafo. A única dificuldade para aplicação é a seleção correta da mistura de solventes, pois a escolha não ideal pode acarretar perda de analitos. O uso de instrumentos para gerar vortex e ultrassom atrelado a esta técnica é comum, bem como técnicas para evaporar e reconstituir a amostra tem apresentado bons resultados (Mostafa e Shaaban, 2018; Salcedo *et al.*, 2019; Viñas *et al.*, 2014, 2015).

Extração/microextração sólido-líquido: Esta é a técnica de extração mais aplicada nas últimas décadas para os IE e permitindo isolar os analitos da matriz, pré-concentrar e ao mesmo tempo realizar o processo de *clean-up*. A versatilidade em termos de escolha do adsorvente é outro fator positivo, em ordem decrescente de aplicação o C₁₈, Oasis HLB® e Florisil são os adsorventes mais utilizados para extração dos IEs. A maior dificuldade atrelada a aplicação da técnica tradicional é o grande volume de amostra, são utilizados entre 250 mL a 4 L de amostra para atingir níveis de concentração compatíveis com a análise em matrizes ambientais em amostras de água. O princípio da técnica se baseia em passar um grande volume de amostra através de um tubo, que contém uma massa de adsorvente imobilizado, onde os analitos são retidos e as impurezas são lavadas, em seguida desorvendo e pré-concentrando os analitos em uma fase líquida compatível com o método de análise (Chevolleau *et al.*, 2016; Dhaini e Nassif, 2014; Liz, De *et al.*, 2017; Salaudeen *et al.*, 2018; Valcárcel *et al.*, 2018).

A microextração sólido-líquido é derivada da extração sólido-líquido, seguindo os mesmos princípios, de forma miniaturizada. Entretanto esta variação da técnica de extração é caracterizada por ter diversas vantagens, assim como menor tempo de extração, baixo custo, menor volume de amostra, consome pouco solvente e gera menos resíduos. Variações da microextração em fase sólida como fibra oca, magnética dispersiva e líquido iônico podem tornar o procedimento ainda mais sensível e seletivo (Hao *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2015; Souza-silva, Gionfriddo e Pawliszyn, 2015; Wang *et al.*, 2019).

Extração assistida por ultrassom: Adotando como ponto de partida o princípio do efeito da cavitação, a aplicação assistida por ultrassom pode ser utilizada para limpar, misturar e acelerar processos de extração. É uma técnica de aplicação simples e baixo custo relativo, não encontra limitações no tipo do solvente e abrange um amplo grupo de compostos e tipos de matrizes (incluindo biológicas). É comum a utilização do ultrassom associado a técnicas de microextração líquido-líquido ou sólido-líquido. Neste ponto, a otimização dos parâmetros como temperatura, composição do solvente e frequência do ultrassom tem melhorando o tempo e eficiência de extração (Ghorbani *et al.*, 2018; Mpupa, Mashile e Nomngongo, 2019; Setyaningsih *et al.*, 2019).

Extração com líquido pressurizado: Método efetivo para grande número de amostras, devido à fácil aplicação que requer pouco tempo (aproximadamente 15 min), volume pequeno de solvente e mínimo de procedimento manual. A operação consiste basicamente em inserir a amostra em uma célula de aço inoxidável onde a extração ocorre a alta pressão e temperatura controlada. As maiores dificuldades atreladas ao uso deste procedimento é o custo do equipamento relativamente alto e necessidade de otimizar o tipo de solvente e temperatura utilizada (Kim, Lee e Don, 2019; Liang *et al.*, 2019; Vila *et al.*, 2015).

Microextração líquido-líquido assistido por Vortex-ultrassom: Procedimento no qual uma pequena fração da amostra é dissolvida em pequeno volume de água destilada (cerca de 10mL), em seguida é aplicado o vortex por 2 min para homogeneizar a amostra, logo após é adicionado sal (NaCl) e aproximadamente 250 μ L do solvente de extração. Na sequência, a solução passa por aproximadamente 5 min de vortex seguidos de 5 min no banho ultrassom, este processo pode ser repetir mais de uma vez, por último a amostra é centrifugada por 30min e em seguida uma alíquota do sobrenadante é coletada e injetada para análise por cromatografia (Vincenzo, Avino e Notardonato, 2016).

Micro extração em fase solida dispersiva: Uma alternativa a extração em fase sólida, onde uma pequena quantidade de adsorvente (μ g ou mg) é adicionada diretamente na amostra, com a finalidade de capturar os analitos, e em seguida este conjunto é agitado por um curto período e posteriormente o sobrenadante é coletado por um processo de filtração e ou

centrifugação, por último os analitos são dessorvidos por meio de extração com uso de solvente e analisados.

Este método foi descrito pela primeira vez na literatura por Anastassiades e Lehotay (2003) utilizado como uma etapa de “*cleanup*” onde uma alíquota de 1 mL do extrato da amostra foi adicionado em um *vial* contendo 25mg de adsorvente e o resultado desta mistura foi agitado em um vortex de forma a distribuir o adsorvente e facilitar a extração, seguido de uma etapa de filtração, desta forma removendo os componentes indesejáveis da matriz. Segundo estes autores, em uma comparação com a extração em fase sólida, a extração em fase sólida dispersiva apresenta as seguintes vantagens: economia de tempo, trabalho, dinheiro e solvente; não há necessidade de pré-condicionar os cartuchos; é necessário menor treinamento e/ou atenção por parte do analista; e toda a massa do adsorvente interage de forma homogênea com a amostra (ANASTASSIADE e LEHOTAY, 2003).

Atualmente a micro extração em fase sólida dispersiva vem sendo utilizada como uma alternativa simples e efetiva tanto para extração dos analitos bem como etapa de purificação de amostras em métodos inovadores como: biomonitoramento de ftalatos em leite materno utilizando resíduos agrícolas como adsorventes Adenuga et al. (2020), determinação de ácido tereftálico utilizando microextração extração de fase sólida dispersiva magnética Hamidi e Nemati (2019); determinação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos Nascimento, Rocha e Andrade (2019); análise de bisfenóis em leite condensado e leite materno Tuzimski e Szubartowski (2019); dentre outras aplicações (Adenuga *et al.*, 2020; Hamidi e Nemati, 2019; Nascimento, Rocha e Andrade, 2019; Tuzimski e Szubartowski, 2019).

3. *Objetivos*

Objetivo geral

Desenvolver uma metodologia analítica para a determinação de quatorze interferentes endócrinos de diferentes grupos (bisfenol, esteroides, alquilfenóis e ftalatos) presentes em matrizes aquosas, utilizando cromatografia líquida acoplada com espectrômetro de massas.

Objetivos específicos

- Desenvolver metodologia para determinação dos IEs por cromatografia líquida ultrarrápida (UFLC);
- Determinar as condições ótimas para extração dos analitos em água mineral, utilizando métodos de estatística multivariada;
- Investigação dos níveis de concentração dos quatorze IEs em amostras de água mineral.

4. Parte experimental

4.1 Reagentes, padrões analíticos e soluções

Para o preparo de soluções, padrões e eluentes foram preparados utilizando água ultrapura com resistividade acima de 18,2 MΩ cm⁻¹ (Milli-Q-Plus, Millipore, USA) filtrada, os solventes orgânicos utilizados, metanol (MeOH) e acetonitrila (ACN) e 2-propanol, foram de grau HPLC (J. T. Baker, USA).

Os padrões utilizados foram BPA (99 % de pureza, Sigma-Aldrich, USA, CAS 80-05-7), E1 (99% de pureza, Sigma-Aldrich, USA, CAS 53-16-7), E2 (99 % de pureza, Sigma-Aldrich, USA, CAS 50-28-2), EE2 (99 % grau HPLC, Sigma-Aldrich, USA, CAS 57-63-6), E3 (98% de pureza, Sigma-Aldrich, USA, CAS 50-27-1), 4-*n*-OP (99 % grau HPLC, Sigma-Aldrich, USA, CAS 1806-26-4), 4-*t*-OP (99 % de pureza, Sigma-Aldrich, USA, CAS140-66-9), 4-*n*-NP (99% de pureza, Sigma-Aldrich, USA, CAS 104-40-5), DMP (99,9 % de pureza, Sigma-Aldrich , USA, CAS 131-11-3), DEP (99,9% de pureza, Sigma-Aldrich, USA, CAS 84-66-2), BBP (96,5 % de pureza, Sigma-Aldrich, USA, CAS 85-68-7), DBP (99,9 % de pureza, Sigma-Aldrich, USA, CAS 84-74-2), DnOP (99,4 % de pureza, Sigma-Aldrich, USA, CAS 117-84-0) e DEHP (99,6 % de pureza, Sigma-Aldrich, USA, CAS 117-81-7).

As soluções estoque de cada um destes padrões listados acima foram preparadas na concentração de 1mg mL⁻¹(1000 mg L⁻¹) em metanol e armazenadas sobre refrigeração, em um frasco âmbar, durante o período de análise sem demonstrar alterações.

Para o preparo das soluções individuais e o mix de padrões, foram realizadas sucessivas diluições a partir da solução estoque. A quantificação foi realizada pelo método da curva de calibração externa, em até 9 níveis de concentração por injeção direta e por meio do procedimento de extração. Para injeção direta dos analitos BPA, E1 E2, EE2, E3, 4-*n*-OP, 4-*t*-OP e 4-*n*-NP os níveis foram de 3 a 100 µg L⁻¹, e para os ftalatos DMP, DBP, DEP, BBP, DEHP, DnOP os níveis foram 50 a 500 µg L⁻¹, onde o limite inferior foi escolhido a partir do menor sinal possível de se distinguir do branco. Por outro lado, os níveis de concentração para curva de calibração realizado o procedimento de extração variou de 50 a 500 ng L⁻¹ para BPA, E1 E2, EE2, E3, 4-*n*-OP, 4-*t*-OP e 4-*n*-NP e variaram de 500 a 5000 ng L⁻¹ para os ftalatos.

Aquisição de amostra

No intuito de avaliar a metodologia proposta foram adquiridas 10 amostras de água mineral de três diferentes marcas popular, 4 da marca A, 4 da marca B e 2 da marca C, vendidas no mercado local na cidade de Salvador, em embalagens plásticas de volume de 500mL não refrigeradas e dentro do prazo de validade, adquiridas entre outubro e dezembro de 2019.

Procedimento de extração

Utilizou-se como base para o desenvolvimento da metodologia de extração o aparato desenvolvido por Nascimento et al., 2019 (Nascimento, Rocha e Andrade, 2019). Em seu trabalho Nascimento obteve êxito aplicando o processo, de microextração sólido líquido dispersiva desenvolvido, para compostos policíclicos aromáticos. Neste trabalho foi utilizado um dispositivo customizado completamente feito de vidro, com o objetivo de evitar possíveis formas de contaminação ao entrar em contato com material plástico. As dimensões do dispositivo de extração estão exibidas na figura 8, que consiste em um tubo cilíndrico de dimensão 150x20 mm com uma ponta de 45x9 mm em uma das extremidades e uma tampa na extremidade oposta.

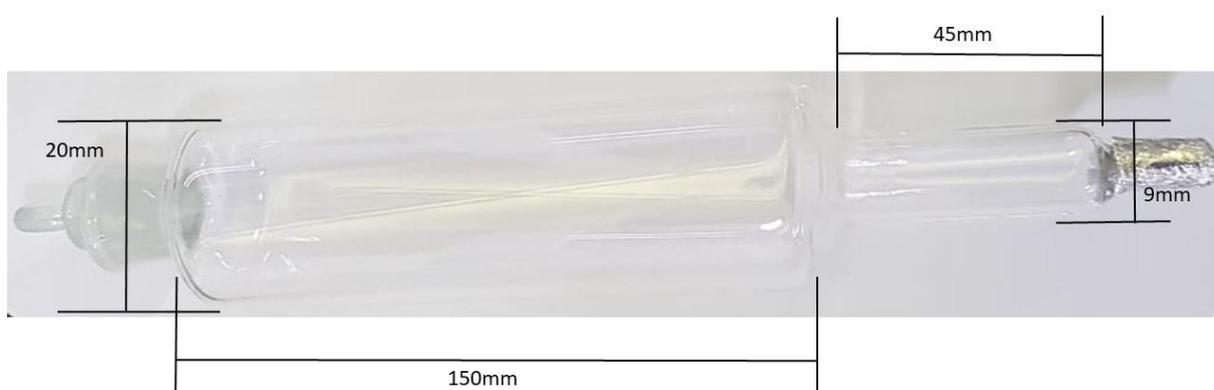


Figura 7 Dimensões do dispositivo customizado de extração desenvolvido para este trabalho, tubo cilíndrico de dimensão 150x20 mm com uma ponta de 45x9 mm em uma das extremidades e uma tampa na extremidade oposta.

Partindo dos mesmos princípios, objetivando obter ganhos em termos de figuras analíticas, avaliou-se uma estratégia de extração que permite a interação mais dinâmica entre o adsorvente e a amostra. Empregou-se uma adaptação da metodologia desenvolvida anteriormente para outros contaminantes emergentes (HPAs e pesticidas), aplicando-se para os IEs, onde foram

otimizados os parâmetros tipo do adsorvente, massa do adsorvente, massa de sal, tempo de agitação e tempo de extração. A figura 8 apresenta um diagrama demonstrando o procedimento de extração, observando-se que os parâmetros exibidos já foram otimizados. A respeito da natureza do adsorvente foram testados os adsorventes C18 (Phenomenex), HLB® (OASIS), Florisil® (Sigma-Aldrich), Tenax (Alltech Associates inc.), Cromosorb Johns-Manville, separadamente, individualmente, e em seguida proporções diferentes da mistura dos adsorventes elencados como melhores resultados segundo o desempenho avaliado pelo fator de concentração. A figura 8 exibe os adsorventes utilizados respeitando a ordem da esquerda para direita: C18, HLB, Florisil, Tenax e Cromosorb.

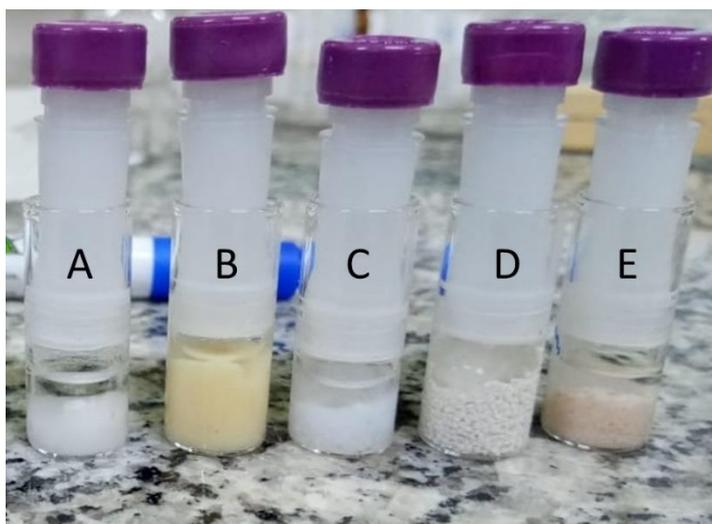


Figura 8 Adsorventes testados para o processo de otimização da extração: A(C18), B (HLB), C(Florisil), D(Tenax) e E(Cromosorb)

O procedimento de extração, resultante deste trabalho, consiste em adicionar uma massa de 80 mg adsorvente no tubo de extração, em seguida é adicionado 1 mL do agente dispersante (2-propanol) e na sequência uma alíquota de 100mL da amostra, o tubo então é fechado e levado a agitação por 25 min na frequência de 1000 rotações por minuto. Finalizado a etapa de agitação, adapta-se uma ponteira de 5 mL contendo 20 mg de lã de vidro, onde será recolhido o adsorvente, na extremidade do tubo contendo a amostra. Em seguida o material é direcionado a um sistema de filtração a vácuo, onde ao término do processo o adsorvente retido na lã de vidro é transferido para um micro extrator, com ajuda de um tubo capilar previamente descontaminado. Adicionalmente são inseridos 500 uL de metanol, e logo após o sistema é fechado e encaminhado para o banho ultrassom por 6min a temperatura 25 °C, onde deve ocorrer o processo de migração dos analitos da adsorvidos na fase sólida para o solvente. Concluído a etapa anterior pressiona-se totalmente a tampa do micro extrator, onde parte da solução é filtrada por um filtro PTFE de 0,22 µm e retida em um inserte presente no mesmo, finalizando desta forma o processo de extração exibidos na figura 9.



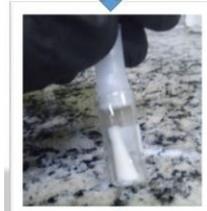
1º C18(80mg);
2º 2-propanol (1mL);
3º Amostra (100mL);



4º Agitação
(25min,1000RPM);



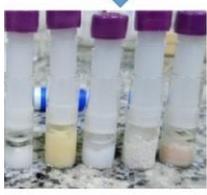
5º Filtração a vácuo;
6º Recolher adsorvente;



7º Transferência;
8º Adicionar 500µL
Metanol;



9º Banho ultrassom
por 6min a 25°C;



10º Fitração

11º Analise com
UFLC-MS.

Figura 9. Diagrama representativo do processo de extração em 11 etapas: 1º) adição da massa do adsorvente no tubo de extração;2º) adição do agente dispersante;3º) adição de 100 mL de amostra;4º) agitação por 25 min a 1000 RPM;5º e 6º) Filtração do sobrenadante e coleta do adsorvente; 7º) Transferência do adsorvente para micro extrator;8º) Adição de 500 uL de metanol;9º) Dessorção em banho ultrassom por 6min;10º) Filtração no micro extrator;11º) Análise no UFLC-MS.

Instrumentação

O método foi desenvolvido utilizando um cromatógrafo líquido ultra-rápido (LC-20AD Prominence, Shimadzu, Japão) equipado com duas bombas de alta pressão (LC-20AD, Shimadzu, Japão), degaseificador (DGU-20A3, Prominence, Shimadzu, Japão), autoamostrador (SIL-20A, Prominence, Shimadzu, Japão), forno de aquecimento da coluna (CTO-20A, Prominence, Shimadzu, Japão), detector de arranjos de fotodiodos (SPD-M20A, Prominence, Shimadzu, Japão) com espectrômetro de massas (LCMS-2020, Prominence, Shimadzu, Japão) ligados em série e cromatógrafo líquido ultra-rápido (LC-20AD_{XR}, Prominence, Shimadzu, Japão) equipado com duas bombas de alta pressão (LC-20AD_{XR}, Shimadzu, Japão), degaseificador (DGU-20A3, Prominence, Shimadzu, Japão), autoamostrador (SIL-20A_{XR}, Prominence, Shimadzu, Japão), forno de aquecimento da coluna (CTO-20A, Prominence, Shimadzu, Japão), detector de arranjos de fotodiodos (SPD-M20A, Prominence, Shimadzu, Japão) e detector de fluorescência (RF-20A, Prominence, Shimadzu, Japão) ligados em série. A coluna utilizada foi a Shim-pack XR-Phenyl (100 x 2.0 mm, 2.20 µm de tamanho de partícula e 12,5 nm de tamanho de poro). Por último um instrumento de banho ultrassônico 4x40W (modelo T760DH, Elma, Alemanha) foi utilizado para limpeza dos materiais e vidrarias.

As condições para separação cromatográfica tiveram como ponto de partida o trabalho de Lisboa (Lisboa *et al.*, 2013) na tentativa de obtenção da separação cromatográfica e análise no UFLC-DAD-FLD, em conjunto com uma nota de aplicação fornecida pela PerkinElmer (PerkinElmer, 2016) e Shimadzu (Watabe *et al.*, 2012). Lisboa aponta as condições e efeitos da utilização de diferentes eluentes, programação de gradiente, vazão e temperatura da coluna em um equipamento similar para a obtenção da separação dos analitos E1, E2, EE2, E3, 4*t*OP, 4*n*OP e 4NOP. O espectrômetro de massas com ionização por *electrospray* (ESI) foi utilizado na voltagem relativa ao *tuning*, com modo de ionização positivo e negativo, com a temperatura do DL mantida em 250 °C, temperatura do bloco de aquecimento em 400 °C, gás de secagem na vazão de 10 L min⁻¹ e gás nebulizador na vazão 2 L min⁻¹. As condições de ionização e outras configurações do espectrômetro de massas da nota de aplicação da Shimadzu, realizada em um equipamento com sistema de ionização semelhante, foram utilizadas como ponto de partida do processo de ionização para os analitos DMP, DEP, DBP, BBP, DEHP e DnOP estudados neste presente trabalho.

A tabela 5 a seguir apresenta as massas e o principal íon formado de cada um dos compostos investigadas. É possível observar na tabela que os alquilfenóis, BPA e os hormônios

tiveram monitoramento através do modo negativo, pois estes possuem facilidade em perder um íon H^+ , logo uma melhor resposta foi obtida quando estes são ionizados negativamente. Enquanto os ftalatos, que não apresentam hidrogênio ácido, e tem dentre seus como grupos funcionais carbonilas, capazes de acomodar uma carga de um próton H^+ , são mais facilmente ionizados na forma catiônica.

Obtenção das figuras de mérito

Devido a necessidade de avaliar a confiabilidade dos dados obtidos através das medições e experimentos realizados garantindo que o método desenvolvido gere informações confiáveis os seguintes parâmetros foram estudados: seletividade, curva analítica e faixa linear, limites de detecção e quantificação, precisão e exatidão.

Tabela 5 Analitos e seus íons monitorados

Analito	Massa molar	M/z
Estriol (E3)	288,38	287 (M^-)
Bisfenol A (BPA)	228,29	227 (M^-)
17 β -estradiol (E2)	272,38	271 (M^-)
17 α -etinilestradiol (EE2)	296,40	295 (M^-)
Estrona (E1)	270,37	269 (M^-)
4- <i>t</i> -octilfenol (4- <i>t</i> -OP)	206,32	205 (M^-)
4- <i>n</i> -octilfenol (4- <i>n</i> -OP)	206,32	205 (M^-)
4- <i>n</i> -nonilfenol (4- <i>n</i> -NP)	220,35	219 (M^-)
Dimetilftalato (DMP)	194,18	195 (M^+)
Dietilftalato (DEP)	222,24	223 (M^+)
Di- <i>n</i> -butilftalato (DBP)	278,34	279 (M^+)
Butilbenzilftalato (BBP)	312,36	313 (M^+)
di(2-etilhexil)ftalato (DEHP)	390,56	391 (M^+)
di- <i>n</i> -octilftalato (DnOP)	390,56	391 (M^+)

A seletividade do método desenvolvido foi avaliada por meio de comparação entre uma matriz isenta de analito e uma matriz fortificada com os padrões dos analitos. Deste modo a

ausência de picos interferentes eluindo no mesmo tempo de retenção comprova a seletividade do método. A respeito da curva analítica e faixa linear, estas foram obtidas através da relação matemática entre o sinal de área do pico obtidas a partir do preparo de no mínimo 5 pontos para cada um dos analitos, onde foram avaliados os coeficientes de regressão e correlação linear.

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ), foram calculados baseados nos parâmetros obtidos da curva analítica, onde o LD é obtido por um valor equivalente a $3,3x(\text{desvio padrão da resposta} / \text{coeficiente angular da curva})$ e o limite de quantificação se iguala a $10x(\text{desvio padrão da resposta} / \text{coeficiente angular da curva})$. A precisão do método desenvolvido foi avaliada em dois níveis diferentes, repetitividade e precisão intermediária, ambas expressas através da estimativa do desvio padrão relativo (RSD). A repetibilidade foi obtida realizando-se 9 experimentos sobre as mesmas condições e a precisão intermediária através da repetição de 9 experimentos durante 3 dias consecutivos totalizando 27 experimentos.

O grau de concordância entre os resultados individuais e um valor de referência, ou seja, a exatidão foi obtida através dos ensaios de recuperação avaliada com adição de padrão (fortificação) em três níveis diferentes de concentração. O fator de recuperação R, foi expresso em termo de porcentagem da quantidade medida dos analitos em relação a quantidade adicionada na fortificação.

Controle de qualidade (QA/QC)

Devido aos níveis reduzidos de concentração das substâncias de interesse, em ordem de até ng L^{-1} , adotou-se uma série de procedimentos para minimizar as possíveis contaminações gerada durante todo o procedimento. Os materiais não volumétricos para a análise foram lavados e sonicados por 20 min em banho usando Extran 10% (Merck, Alemanha) e em seguida aquecidos em mufla por 4 h a 450°C para descontaminação. Os instrumentos, solventes, reagentes, vidrarias, adsorventes e o branco do método foram avaliados visando verificar a presença de algum pico interferente. O branco instrumental do sistema UFLC-MS foi avaliado através da injeção do solvente de extração na ausência dos analitos. A avaliação da ausência de interferentes no método foi avaliada através da análise de uma amostra onde foram realizadas todas as etapas da extração, sem a presença dos analitos. Nenhum pico interferente foi encontrado com o mesmo tempo de retenção que os analitos na avaliação do instrumento, solventes, reagentes e vidrarias.

Planejamento de experimentos

Conforme citado anteriormente o desenvolvimento do método passou por etapas univariadas, na avaliação da separação cromatográfica e escolha do tipo de adsorvente a ser utilizado, bem como etapas de análise multivariadas para otimização das condições de extração. Os parâmetros a serem otimizados como massa do adsorvente, massa de sal, tempo de agitação e tempo de extração foram investigados em um processo de triagem a partir de um planejamento fatorial, onde se elencou os principais fatores que influenciavam o processo, sua significância e a interação entre estes, o tratamento de dados foi realizado no software Statistica 7.0 para obtenção dos modelos matemáticos, estimativa dos efeitos. A partir dos resultados do planejamento fatorial aplicou-se um tratamento de superfície de resposta pelo modelo da matriz de Doehlert (Doehlert, 1970) com três variáveis, que permitem avaliar em mais níveis os fatores considerados mais importantes com um menor número de experimentos, obtendo-se então os valores ótimos dentro do domínio estabelecido.

Tratamento de dados

O software Microsoft Excel 2016 (Microsoft, USA) foi utilizado para realizar o tratamento de dados bem como produção de tabelas, curva analítica, e obtenção do modelo de regressão. Adicionalmente a análise de dados estatísticos foi realizada no software Statistica 7.0 (StatSoft, Tulsa, Ok, USA) onde foram calculados os modelos matemáticos para o processo de otimização multivariada. O modelo matemático proposto através da otimização multivariada, fez-se avaliado em termos de análise de variância (ANOVA, $p < 0,05$), a significância do modelo matemático, a falta de ajuste e efeito de cada fator.

5. Resultados e discussão

Separação cromatográfica

Foram desenvolvidos dois métodos analíticos onde todas as condições foram avaliadas de forma univariada, inicialmente em um cromatógrafo líquido ultrarrápido acoplado em série a detectores de fluorescência e arranjo de diodos (UFLC-FLD-DAD). O ponto de partida foi o trabalho publicado na Talanta (Lisboa et al., 2013a), onde foi desenvolvido um método simples para a determinação de BPA, alquilfenóis, E1, E2, E3 e EE2. Entretanto neste presente trabalho um grupo adicional de 6 analitos fora adicionado, os ftalatos DMP, DEP, DBP, BBP, DEHP e DNOP. A segunda metodologia foi desenvolvida em um cromatógrafo líquido ultrarrápido

acoplado com espectrômetro de massas (UFLC-MS), tendo como ponto de partida o trabalho anterior. Aproximadamente 240 programações foram escritas e testadas em termos de variação dos parâmetros de separação e parâmetros de ionização, um breve resumo está descrito a seguir partindo do método desenvolvido por outros autores até atingir as condições de separação desenvolvidas neste presente trabalho.

Os autores Lisboa et al. utilizaram um sistema de cromatografia líquida ultrarrápida com detector de fluorescência, uma coluna do tipo Shim-pack XR-ODS C18 (2.0 mm ID x 50 mm), eluentes água (A) /acetonitrila (B), comprimento de onda de excitação e emissão 280/306 nm, fluxo 0,120 mL min⁻¹, temperatura da coluna 60°C. A programação de eluentes do trabalho citado se iniciava na proporção de 45% do eluente B; passando de 45% para 90% a concentração do eluente B em 3,5min; manteve-se em 90% por 0,5 min; aumentou-se de 90% para 100% em 0,2 min; reduziu-se de 100% para 45% durante 0,3 min; por último manteve-se o eluente B em 45% por 6,5 min. Os resultados, segundo os autores, gerou uma corrida cromatográfica de 10 min com os limites de detecção variando de 4 a 56 µg L⁻¹ na análise por injeção direta e desvio relativo padrão da área do pico menor que 6,1% nos testes *inter-day*.

As tentativas de reproduzir as condições apresentadas falharam, pois a separação dos analitos não ocorreu de forma desejável tornando difícil distinguir com plena certeza qual dos picos representava uma dada espécie (figura 10). Para contornar este problema foram testadas diversas programações de gradientes partindo de concentrações variando entre 20% a 50%, o que resultou em deslocamento quase por completo dos picos possíveis de serem identificados; observou-se que os tempos de retenção aumentavam conforme reduzia a concentração do eluente B, havendo a necessidade de adequar as mudanças na programação de gradiente, conforme o tempo dos analitos, afim de favorecer a separação.

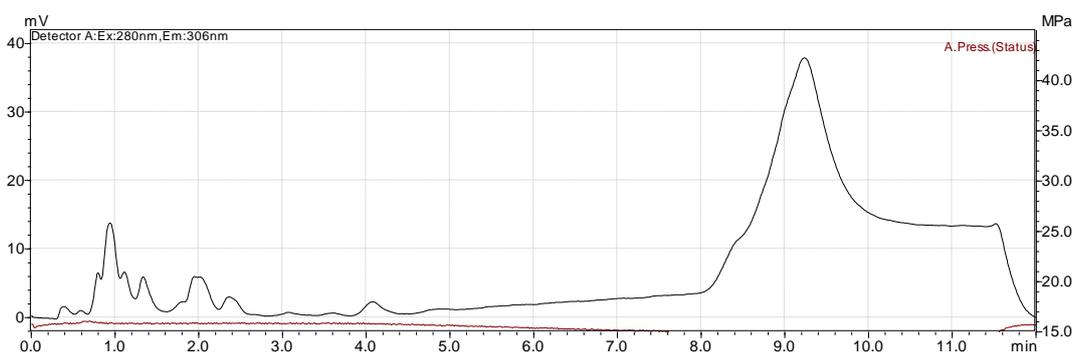


Figura 10 Cromatograma obtido aplicando o método de separação cromatográfico de Lisboa et al. (2013).

Após diversos testes com a variação do gradiente de concentração, fluxo e temperatura do forno, obteve-se melhor resultado com uma nova programação de eluentes customizada. A

princípio a variação da temperatura do forno, dentre 40 a 60°C, não apresentou efeito observável no tempo de retenção ou eficiência de separação. No entanto, maiores temperaturas ocasionaram redução da pressão do sistema. O aumento do fluxo da fase móvel resultara em corridas mais curtas, entretanto tornava mais difícil a distinção entre os picos. O aumento da concentração do gradiente B, observado em testes isocrático (30% a 60% variando de 5 em 5) e gradiente, levou a menores tempos de retenção; por outro lado dificultou a separação dos picos; a concentrações mais altas os picos passavam a co-eluir em um tempo de retenção mais curto. Após diversos testes, variando os parâmetros apresentados acima, chegou-se a uma programação capaz de possibilitar pela primeira vez a separação dos picos, onde a partir da injeção individual de cada um dos padrões os picos foram identificados em um tempo total de corrida de 13min, resultando no cromatograma é exibido na figura 11.

A seguinte programação apresentou melhores resultados: iniciando em 37% do eluente B por 1min; aumentando-se de 37% para 60% durante 1,8min; passando de 60% para 65% durante 1,2min; em seguida mantendo-se em 65% por 3min; reduzindo de 65% para 37% em 0,5min; mantendo 37% por 2,5min.

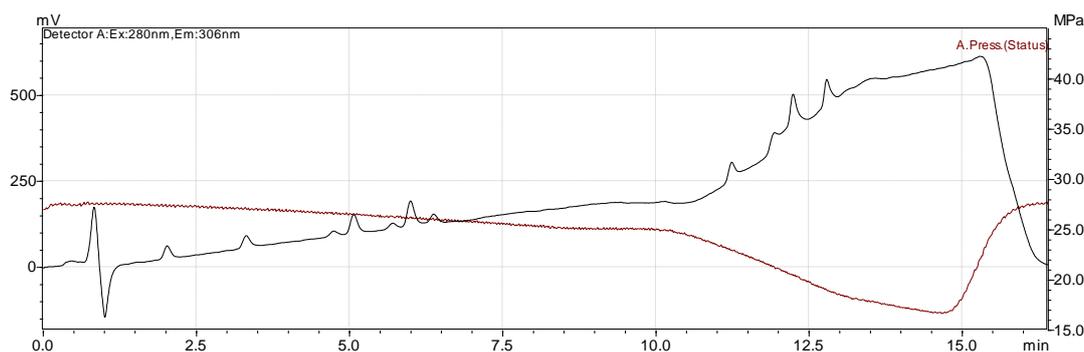


Figura 11 Cromatograma em FLD para os hormônios e alquilfenóis obtidos após mudanças na programação de eluentes.

O ponto de partida para a análise dos ftalatos foi a tese de Souza (Souza, 2015). Este desenvolveu dois métodos para análises cromatográficas. O primeiro método permitirá separar e analisar os alquilfenóis e ftalatos e o segundo método hormônios e BPA. Ambos os métodos utilizando a coluna Shim-pack XR-ODS (2 mm x 150 mm, 2,2 µm), equipamento UFLC-DAD-FLD e eluentes (água/acetonitrila). Para a detecção dos alquilfenóis, BPA e hormônios os comprimentos de onda de emissão e excitação monitorados foram 280 e 306 nm, enquanto para os ftalatos o comprimento de onda utilizado foi 254 nm.

Não se obteve êxito ao tentar adaptar o método proposto por Souza (2015) para análise dos ftalatos (figura 12), pois não se encontrava disponível uma coluna cromatográfica com exatamente as mesmas especificações e adicionalmente acredita-se que o cromatógrafo disponível não se encontrava nas mesmas condições que o trabalho citado. Logo testou-se

utilizar uma coluna do tipo Shimp-pack XR-ODS (100 mm x 2.0 mm, 2,2 μm) e em um segundo momento a coluna Shim-pack XR- Phenyl (100 x 2.0 mm, 2.20 μm). Esta última apresenta polaridade média aplicada principalmente para compostos aromáticos funcionalizados e hidrocarbonetos aromáticos, que resultou em melhor separação dos picos. Utilizando a coluna Phenyl e uma nova programação de gradientes foi possível identificar quatro dos seis picos partindo da metodologia similar à proposta já realizada; logo, a partir deste ponto foram realizados testes para obtenção das condições da separação e identificação dos demais ftalatos figura 13.

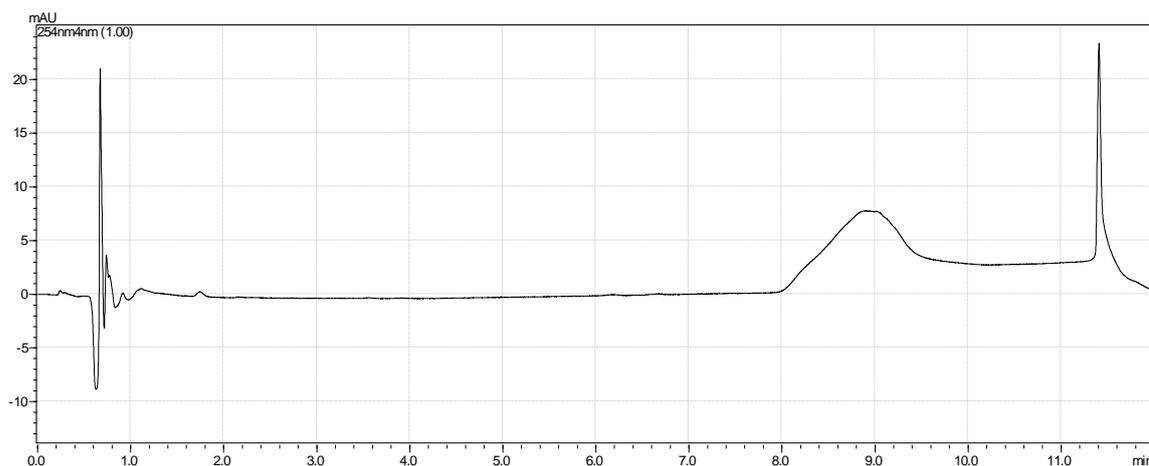


Figura 12 Aplicação da separação cromatográfica dos Ftalatos no UFLC-DAD-FLD seguindo metodologia de Souza (2015).

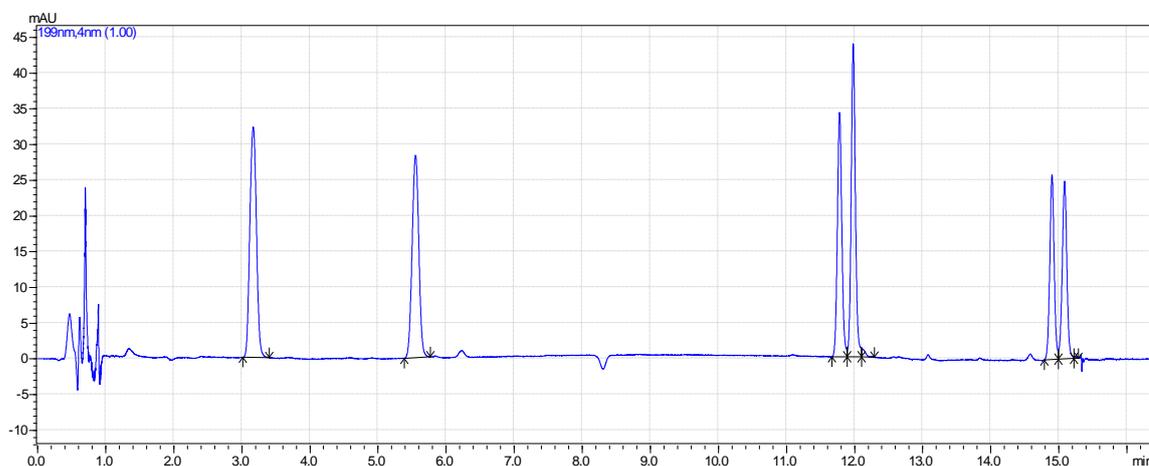


Figura 13 Separação cromatográfica obtida utilizando a coluna Shim-pack XR- Phenyl (100 x 2.0 mm, 2.20 μm) com injeção de padrão dos ftalatos 2 mg L⁻¹.

Após os devidos cuidados, obteve-se dois métodos aparentemente eficientes para determinação destas espécies: o primeiro para os hormônios esteroidais e alquilfenóis e um segundo método para os ftalatos. Não obstante, buscou-se mesclar as condições destas programações com a finalidade de obter uma única corrida que mantivesse a eficiência de

separação. A separação então foi otimizada em termos das seguintes variáveis instrumentais: programação de eluentes, temperatura do forno e vazão. Por fim obteve-se um método de separação em uma única corrida utilizando um UFLC-FLD-DAD cujo resultado final da separação, está exibido na figura 15.

A seguinte programação apresentou melhores resultados: iniciando em 30% do eluente B (acetonitrila) aumentando até 48% em 7,6min, em seguida mantendo-se em 48% por 1,6min, após este intervalo a concentração de B aumentou até atingir 75% no intervalo de 2,8min, subindo de forma mais lenta até atingir 82% durante 2min, retornando a 30% em 0,6min e mantendo-se por 1,8min.

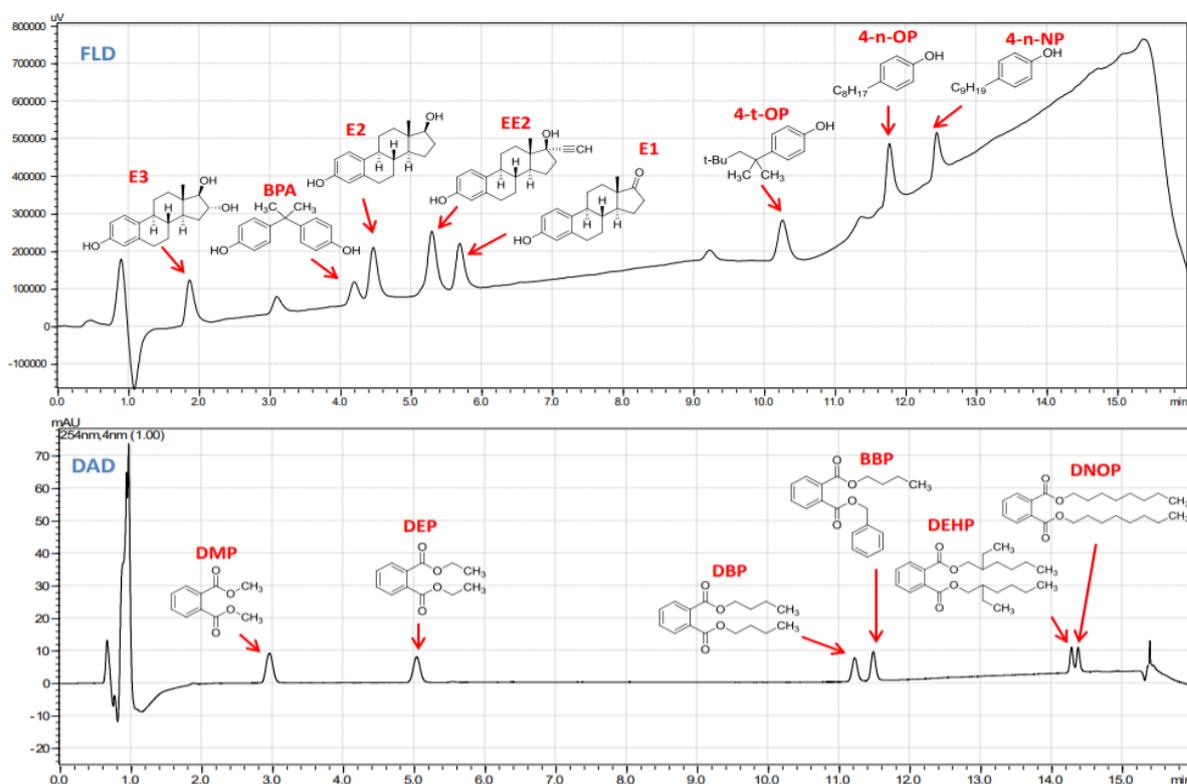


Figura 14 Resultado final da separação cromatográfica realizada no UFLC-DAD-FLD.

Em seguida, fora utilizado um cromatógrafo líquido ultrarrápido acoplado a um espectrômetro de massas (UFLC-MS) de marca e modelo similar, onde a coluna cromatográfica, Shim-pack XR- Phenyl (100 x 2.0 mm, 2.20 μm), foi transferida de um equipamento para o outro, e assim manteve-se até a finalização deste trabalho. Neste caso, o ponto de partida foram as notas de aplicação da PerkinElmer em 2016 em um instrumento com sistema de ionização similar, condições estas tais como temperatura do DL, 250°C, aquecedor de bloco a 400°C, vazão do gás nebulizador a 2 L min^{-1} e gás de secagem a 10 L min^{-1} . No entanto, na transferência do método de um equipamento para o outro percebeu-se que houve

perda na eficiência da separação dos isômeros DEHP e DnOP (m/z 391), resolvidos com a mudança na programação de gradientes, resultando na programação descrita a seguir.

A programação de eluentes se iniciou em 30% do gradiente B, aumentando até atingir o valor de 48% em 5min, seguido de uma variação mais rápida até atingir 80% em 5min e em seguida 95% em um intervalo de 3min, retomando as condições iniciais em 2min e acrescentando mais 1min de repouso. Os íons foram monitorados no modo SIM positivo em 4 janelas de tempo, descritas na tabela 6. O cromatograma resultante é exibido na figura 15.

Tabela 6 Segmentos e íons monitorados no modo SIM

Segmento	Modo de monitoramento	de Íon monitorado(s)	Analito(s)
3 a 4,5min	SIM (+)	195	DMP
4,5 a 6min	SIM (+)	223	DEP
7,5 a 8,5min	SIM (+)	279, 313	DBP, BBP
11,5 a 12,5min	SIM (+)	391	DEHP, DnOP

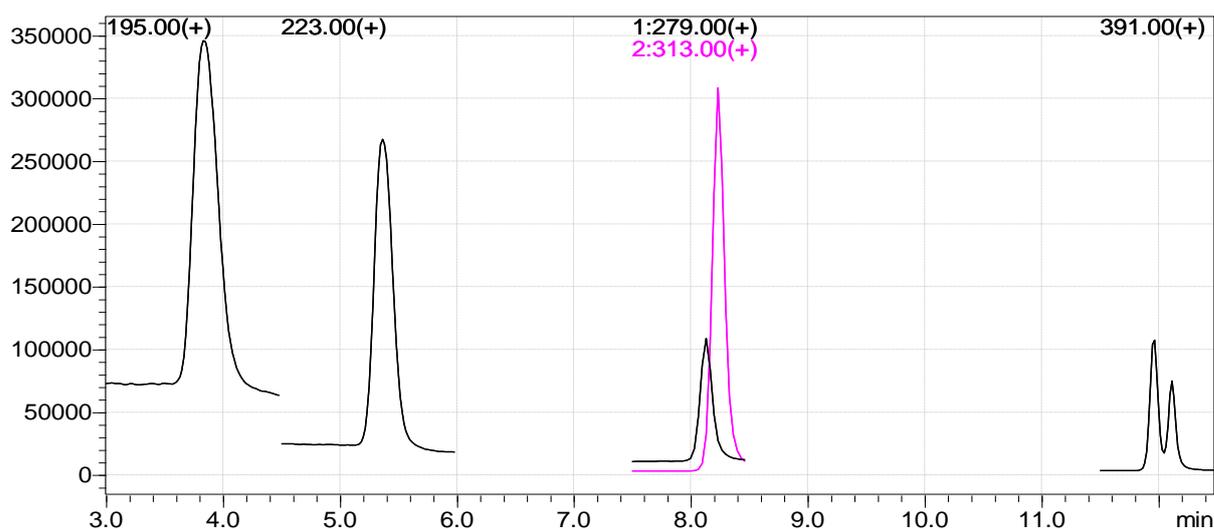


Figura 15 Cromatograma (modo SIM+) obtido dos Ftalatos :DMP (3,85min), DEP (5,40min), DBP(8,22min), BBP (8,07min), DEHP (11,9min) e DnOP(12,07min).

Em seguida buscou-se adicionar os hormônios, alquilfenóis e BPA a programação desenvolvida no UFLC-MS, surgiu então a necessidade de ajustes na programação, onde alguns segmentos foram divididos em eventos positivos e negativos simultaneamente. Por fim, a programação de eluentes foi modificada, aumentando-se a concentração inicial do eluente B afim de obter uma corrida mais curta, mas sem perder a eficiência da separação chegando a programação descrita a seguir:

A programação de eluentes se inicia em 45% do gradiente B, passa de 45% para 91% em 11min, retorna a 45% no intervalo de 1 min onde se mantem por mais 3 minutos, totalizando 15minutos de corrida, sendo que os 3 min finais são necessários para reestabelecer as condições

iniciais e estabilizar o sistema. Os eventos, segmentos e íons monitorados para cada um dos analito está descrito na tabela 7.

Tabela 7 Segmentos e íons monitorados no modo SIM com os 14 analitos

Segmento	Evento	Modo de monitoramento	Íon monitorado	Analito(s)
1,3 a 2min	Único	SIM(-)	287	E3
2 a 4min	Evento 1	SIM(-)	227, 271, 295, 269	BPA, E2, EE2, E1
2 a 4min	Evento 2	SIM(+)	195, 223	DMP, DEP
5,5 a 8,5min	Evento 1	SIM(-)	205, 219	4- <i>t</i> -OP, 4- <i>n</i> -OP, 4-NP
5,5 a 8,5min	Evento 2	SIM(+)	279, 313	DBP, BBP
10,5 a 12min	Único	SIM(+)	391	DEHP, DnOP

Procedimento de extração

O procedimento de extração dos analitos foi realizado utilizando um dispositivo customizado, de vidro, aplicando o princípio da micro extração em fase solida dispersiva, conforme Nascimento (Nascimento, Rocha e Andrade, 2019), como uma alternativa a extração de contaminantes orgânicos ,com alta eficiência e utilização menor volume de amostra, que permite uma interação mais dinâmica entre os analitos e o adsorvente frente a aplicação do procedimento de extração em fase sólida utilizando o adsorvente imobilizado em um cartucho. Uma outra vantagem na customização do dispositivo é a possibilidade de evitar o contato com plástico e outros materiais que poderiam vim a contaminar as amostras.

Neste procedimento uma massa definida de adsorvente é inserida em um cilindro de tubo de vidro, em seguida é adicionado 1mL do agente dispersante, que promove maior interação entre o adsorvente e solução; logo após uma alíquota da amostra é transferida para o tubo, em seguida uma massa de sal (NaCl) é inserida e na sequencia o sistema é vedado e sujeito a um uma vigorosa agitação por um vortex (1000rpm) por um tempo determinado. Ao final da agitação, abre-se a extremidade menor do tubo, onde é adaptado uma ponteira contendo lã de vidro e a amostra segue para o processo de filtração a vácuo, na etapa seguinte transfere-se o adsorvente para um micro extrator onde é adicionado 500µL do solvente de extração (metanol) que é levado para banho ultrassom, transferindo os analitos do adsorvente para o solvente de extração, e posteriormente é injetado no cromatógrafo.

Para garantir maior desempenho e emprego deste procedimento, se tornou necessário otimizar diversos parâmetros envolvidos como: tipo de adsorvente, massa do adsorvente, tempo de agitação, massa de sal, tempo de agitação, tempo de extração e volume da amostra. Devido

a limitação do número de unidades do tubo, tempo de preparação e execução a otimização foi dividida em etapas onde os grupos de experimentos pudessem ser realizados em um mesmo dia dispondo das mesmas condições. Na primeira etapa ocorreu a avaliação do tipo do adsorvente, dentre os disponíveis, em condições pré-definidas, utilizou-se 100mg do adsorvente, 0,5g de NaCl, agitação em vortex por 30min, extração em ultrassom 20min e uma solução estoque contendo os analitos com a concentração de $10\mu\text{gL}^{-1}$ para os ftalatos e $5\mu\text{gL}^{-1}$ para os demais. As áreas de integração dos sinais foram traduzidas em concentração a partir da aplicação de uma curva de calibração por injeção direta, e então foi calculado o fator de concentração para cada um dos adsorventes e realizado uma comparação por normalização, os resultados estão descritos na tabela 8, avaliados a partir do valor total que representa a soma dos resultados para os 14 analitos.

Tabela 8 Resultados da comparação entre os tipos de adsorvente

<i>Analito</i>	<i>C18</i>	<i>HLB</i>	<i>Cromosorb</i>	<i>Tenax</i>	<i>Florisil</i>
<i>E3</i>	1,00	0,41	0,00	0,00	0,28
<i>BPA</i>	1,00	0,18	0,00	0,30	0,04
<i>E2</i>	1,00	0,16	0,00	0,55	0,63
<i>EE2</i>	1,00	0,12	0,00	0,55	0,48
<i>E1</i>	1,00	0,06	0,00	0,45	0,70
<i>4-t-OP</i>	0,85	0,10	0,11	1,00	0,38
<i>4-n-OP</i>	0,78	0,03	0,53	1,00	0,71
<i>4-n-NP</i>	0,82	0,01	0,85	1,00	0,81
<i>DMP</i>	0,48	0,00	0,00	0,14	1,00
<i>DEP</i>	1,00	0,35	0,00	0,48	0,22
<i>DBP</i>	1,00	0,00	0,45	0,85	0,58
<i>BBP</i>	1,00	0,00	0,42	0,64	0,64
<i>DEHP</i>	0,19	0,00	1,00	0,11	0,22
<i>DNOP</i>	0,19	0,00	1,00	0,11	0,22
<i>Total</i>	11,30	1,42	4,36	7,19	6,93

O fator de concentração foi calculado dividindo a concentração encontrada após a extração pela concentração inicial da solução. Dentre os adsorventes avaliados nesta etapa o C18 apresentou melhor resultado para 8 dos 14 analitos e resultado próximo ao melhor para 3 outros analitos. O HLB apresentou desempenho baixo, o Cromosorb teve bom resultado para 2 ftalatos, entretanto não apresentou resultado satisfatório para as outras espécies, o Tenax apresentou bom resultado para os 3 alquilfenóis e o Florisil apresentou melhor resultado para o

dimetilftalato. Em seguida optou-se por testar a mistura binária dos adsorventes C18 e Cromosorb nas proporções 25:75, 50:50, 75:25, afim de avaliar possível melhora no desempenho da extração para os ftalatos DNOP e DEHP, os resultados podem ser observados na tabela 9.

Tabela 9 Resultados para mistura binaria C18 e Cromosorb

<i>Analito</i>	<i>C18</i>	<i>75: 25</i>	<i>50:50:00</i>	<i>25:75</i>	<i>Cromosorb</i>
<i>E3</i>	1,00	0,60	0,28	0,26	0,00
<i>BPA</i>	1,00	0,91	0,42	0,50	0,00
<i>E2</i>	0,81	1,00	0,45	0,61	0,00
<i>EE2</i>	0,94	1,00	0,51	0,69	0,00
<i>E1</i>	0,74	1,00	0,43	0,50	0,00
<i>4-t-OP</i>	0,88	0,98	0,74	1,00	0,12
<i>4-n-OP</i>	0,71	0,84	0,72	1,00	0,48
<i>4-n-NP</i>	0,77	0,79	0,72	1,00	0,80
<i>DMP</i>	1,00	0,79	0,00	0,00	0,00
<i>DEP</i>	1,00	0,57	0,55	0,61	0,00
<i>DBP</i>	1,00	0,47	0,52	0,56	0,45
<i>BBP</i>	1,00	0,59	0,64	0,68	0,42
<i>DEHP</i>	0,19	0,46	0,63	0,98	1,00
<i>DNOP</i>	0,19	0,37	0,63	1,00	1,00
<i>Total</i>	11,22	10,37	7,25	9,39	4,27

A mistura dos adsorventes resultou no aumento do sinal para os dois ftalatos assim como esperado, no entanto ocorreu a redução do sinal para outros seis analitos, logo não visto como vantagem utilizar a mistura destes adsorventes e se seguiu utilizando o C18 puro como adsorvente a partir deste ponto.

O próximo passo foi avaliar o efeito das condições da extração através de um planejamento fatorial fracionado do tipo 2^{k-1} , onde os fatores escolhidos como variáveis independentes foram massa do adsorvente, massa de sal, tempo de agitação, tempo de dessorção e um modelo de resposta múltipla foi adotado como variável dependente ou resposta.

Levando em consideração a quantidade de respostas individuais obtidas para cada um dos analitos e a necessidade em realizar uma extração simultânea e eficiente, adotou-se o modelo de resposta múltipla (RM) apresentado por Santos et al. (Santos *et al.*, 2009), de acordo com a equação (1):

$$RM = [R(X1)/LS(X1) + R(X2)/LS(X2) + \dots + R(Xn)/LS(Xn)] \quad (\text{eq.1})$$

onde $R(X_n)$ é o sinal analítico para um composto em um experimento particular e $LS(X_n)$ é o maior sinal obtido dentre todos os experimentos para um dado composto. A significância estatística de cada um dos fatores e a interação entre eles foram avaliados aplicando a análise de variância (ANOVA) utilizando do software *Statistica*.

Tabela 10 Planejamento fatorial $2K^{-1}$

<i>Experimento</i>	<i>Massa adsorvente (mg)</i>	<i>Massa NaCl (g)</i>	<i>Tempo de agitação (min)</i>	<i>Tempo de dessorção (min)</i>	<i>Resposta múltipla</i>
1	80 (-1)	0,0 (-1)	10 (-1)	10 (-1)	10,9
2	120 (+1)	0,0 (-1)	10 (-1)	20 (+1)	8,80
3	80 (-1)	1,0 (+1)	10 (-1)	20 (+1)	7,32
4	120 (+1)	1,0 (+1)	10 (-1)	10 (-1)	9,50
5	80 (-1)	0,0 (-1)	20 (+1)	20 (+1)	10,4
6	120 (+1)	0,0 (-1)	20 (+1)	10 (-1)	12,2
7	80 (-1)	1,0 (+1)	20 (+1)	10 (-1)	14,2
8	120 (+1)	1,0 (+1)	20 (+1)	20 (+1)	8,09
9	100 (0)	0,5 (0)	15 (0)	15 (0)	11,2
10	100 (0)	0,5 (0)	15 (0)	15 (0)	10,4
11	100 (0)	0,5 (0)	15 (0)	15 (0)	10,5

Interpretando o gráfico de Pareto, resultado do planejamento fatorial figura 16, utilizado como processo de triagem, foi observado que o tempo de dessorção possui maior efeito significativo (em modulo) dentre os fatores estudados, no entanto o efeito negativo sugere uma diminuição do tempo de dessorção, ou seja, o dentro do intervalo estabelecido a resposta diminui com o aumento do tempo. A diminuição da resposta com aumento do tempo de dessorção deve ocorrer devido a adsorção dos analitos no C18, concluindo que é necessário trabalhar em um domínio experimental com tempo de dessorção mais curto, adotou-se então um intervalo dentre 5 a 10min para próxima etapa.

O tempo de agitação apresentou efeito significativo e positivo, indicando que o aumento do tempo de agitação proporciona melhor resposta, ou seja, quando maior o período de contato entre a solução e o adsorvente disperso maior será quantidade de analito será adsorvida, logo ampliou-se o intervalo de tempo do domínio experimental para próxima etapa de estudo, antes de 10 a 20min para 20 a 40min.

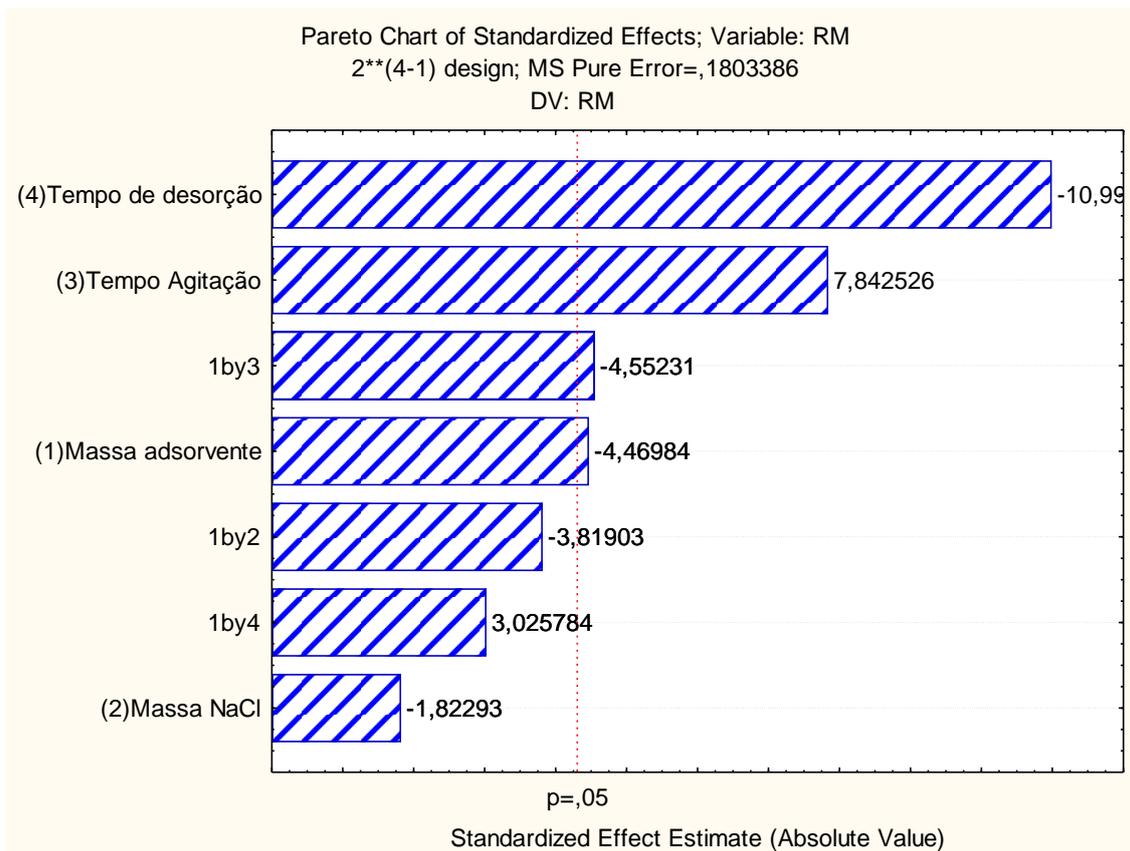


Figura 16 Gráfico de Pareto obtido no Statistica 7.0 para o planejamento fatorial

A massa do adsorvente apresentou efeito significativo e negativo, indicando que o sinal analítico diminui com o aumento da massa. Apesar de se esperar que com uma maior massa de adsorvente fosse ser possível capturar uma maior quantidade de analitos, temos que levar em consideração neste ponto que o volume de solvente utilizado na extração dos analitos do adsorvente é constante devido a capacidade do micro extrator (500 μ L), alterando a proporção entre a massa de adsorvente e o volume de solvente de extração, no entanto este comportamento necessita de outros procedimentos para ser comprovado. Logo, utilizou-se um domínio experimental entre 40 a 80mg de adsorvente na próxima etapa de otimização.

A massa de NaCl adicionada apresentou resultado insignificante, logo é de se presumir que o efeito *salting-out* não contribui com o aumento da resposta, não favorecendo o processo de migração dos analitos para o adsorvente, logo não será mais utilizado a partir deste ponto.

A respeito das interações entre fatores, a interação entre a massa do adsorvente e tempo de agitação apresentou um efeito sinérgico negativo e significativo, demonstrando diminuir a massa de adsorvente e o tempo de dessorção favorece o processo de extração. As demais interações entre os fatores foram insignificantes. Na figura 13 é possível observar a correlação dentre os valores obtidos experimentalmente e o modelo matemático desenvolvido, nesta etapa

o ajuste do modelo resultante foi maior que 0,95 e o coeficiente de correlação linear maior que 0,98 o indicativo de um ótimo ajuste.

De acordo com os resultados obtidos no procedimento de triagem foram eliminados os fatores que não tiveram efeitos significativos e ajustado o domínio experimental para os fatores significativos objetivando obter os pontos críticos, de maior desempenho, para o processo de extração a partir da aplicação da aplicação do planejamento de Doehlert apresentado na tabela 11.

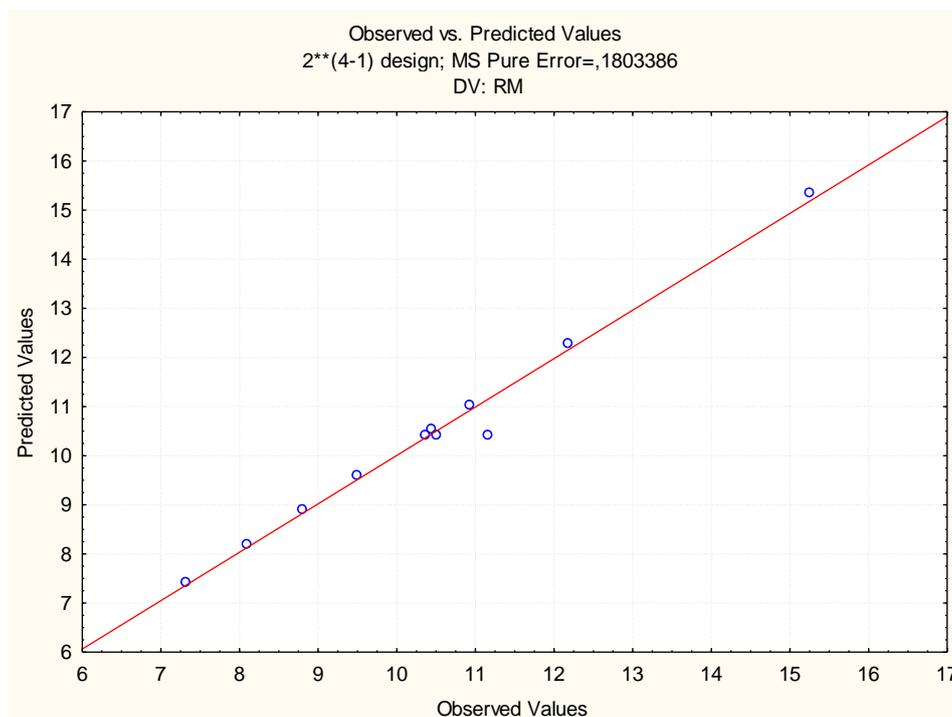


Figura 17 Avaliação do ajuste do modelo Valores observados vs Preditos, Ajuste 0,95273; $R^2=0,98582$; erro puro= 0,18033386.

Partindo dos resultados obtidos no planejamento experimental optou-se por modificar o domínio conforme a adequar com as necessidades propostas utilizando o design experimental da matriz de Doehlert, onde são atribuídos níveis diferenciados para cada um dos fatores. Nesta etapa foram otimizados os fatores tempo de agitação, tempo de dessorção e massa de adsorvente nesta ordem de prioridade nos níveis respectivamente em 7, 5 e 3 e a resposta múltipla foi adotada conforme descrito anteriormente.

Os resultados obtidos foram avaliados no programa Statistica 7.0 e a equação 2 descreve o modelo obtido através do domínio experimental utilizado:

$$\begin{aligned}
 \text{RM} = & 11,8310 (\pm 0,6565) + 0,9904 (\pm 0,3128)\text{TD} - 0,4211(\pm 0,2554)\text{TD}^2 + 0,4063 \\
 & (\pm 0,5418)\text{TA} - 4,7152(\pm 0,7662)\text{TA}^2 - 0,3555(\pm 0,5108)\text{MA} - 1,3553(\pm 0,6370)\text{MA}^2 + \\
 & 2,2128(\pm 0,6255)\text{TD}_x\text{TA} - 0,8639(\pm 0,6595)\text{TD}_x\text{MA} - 3,3521(\pm 1,1420)\text{TA}_x\text{MA} \quad (\text{eq.2})
 \end{aligned}$$

onde RM é o resultado em resposta múltipla, TD se refere ao tempo de dessorção, TA se traduz em tempo de agitação e MA em massa de adsorvente. O gráfico de Pareto na figura 14 indica que o termo quadrático do tempo de agitação foi a variável de maior efeito significativo, seguido pela interação entre tempo de agitação e tempo de dessorção.

Tabela 11 Design experimental da matriz de Doehlert aplicada para três fatores

<i>Experimento</i>	<i>Tempo de dessorção(min)</i>	<i>Tempo de Agitação(min)</i>	<i>Massa de Adsorvente(mg)</i>	<i>Resposta múltipla</i>
1	7,5 (0)	30 (0)	60 (0)	12,8
2	10 (+1)	30 (0)	60 (0)	11,5
3	8,75 (+0,5)	40 (+0,866)	60 (0)	11,1
4	8,75 (+0,5)	33,34 (+0,289)	80 (+0,817)	10,8
5	5,0 (-1)	30 (0)	60 (0)	10,4
6	6,25 (-0,5)	20 (-0,866)	60 (0)	9,60
7	6,25 (-0,5)	26,66 (-0,289)	40 (-0,817)	9,31
8	8,75 (+0,5)	20 (-0,866)	60 (0)	8,67
9	8,75 (+0,5)	26,66 (-0,289)	40 (-0,817)	11,0
10	6,25 (-0,5)	40 (+0,866)	60 (0)	7,64
11	7,5 (0)	36,66 (+0,577)	40 (-0,817)	11,7
12	6,25 (-0,5)	33,34 (+0,289)	80 (+0,817)	9,36
13	7,5 (0)	23,66 (-0,577)	80 (+0,817)	10,8
14	7,5 (0)	30 (0)	60 (0)	12,2
15	7,5 (0)	30 (0)	60 (0)	11,4
16	7,5 (0)	30 (0)	60 (0)	11,9
17	7,5 (0)	30 (0)	60mg (0)	11,3
18	7,5 (0)	30 (0)	60mg (0)	11,3

Os valores críticos foram calculados a partir da derivação do modelo matemático, resultando nos valores críticos -0,553897, -0,457006 e 0,714478 para os fatores tempo de dessorção, tempo de agitação e massa de adsorvente respectivamente, que foram traduzidos em valores reais através da equação 3 demonstrada a seguir e resumidos na tabela 12.

$$C = [(X_i - P_c) / (V_{max} - P_c)] K \quad (\text{eq. 3})$$

onde C representa o valor codificado, Xi o valor real, Pc o valor do ponto central e K o valor máximo codificado.

Tabela 12 Valores otimizados para a extração através da matriz de Doehlert

Fator	Min. Observado	Valor crítico	Max. Observado	Valor Real
Tempo de dessorção	-1,00000	-0,553897	1,000000	0:06:07
Tempo de Agitação	-0,86600	-0,457006	0,866000	0:24:43
Massa de Adsorvente	-0,81700	0,714478	0,817000	77,5 mg

A superfície de resposta obtida do design experimental é ilustrada nas figuras 18. Em ordem de comprovar os resultados, foram realizados três experimentos utilizando as condições otimizadas de tempo de dessorção, tempo de agitação e massa de adsorvente e em seguida comparou-se com os resultados previsto pelo modelo matemático tabela 13, onde o resultado expresso em média mais intervalo de confiança ($12,29 \pm 1,57$) não é estatisticamente diferente do valor previsto de 11,42. Portanto, o resultado encontra-se dentro do valor previsto pelo modelo e o valor da média indica que possa ser que os resultados reais sejam mais eficientes até do que o previsto pelo modelo.

A comprovação dos resultados da otimização foi realizada de duas formas, a primeira é comprovar experimentalmente que os valores obtidos nas condições ideais conferem com os valores preditos pelo modelo matemático. Substituindo o resultado dos valores críticos para cada fator na equação 2, obtemos resultado predito no valor de 11,42. O resultado obtido experimentalmente nas condições otimizadas, exibidos na tabela 13, quando expressos em média seguidos do intervalo de confiança (95%) pode ser expresso como $12,2 \pm 1,57$ e este valor representado, dentro da faixa de confiança, não é estatisticamente diferente de 11,42, logo o resultado obtido experimentalmente confere com o resultado teórico.

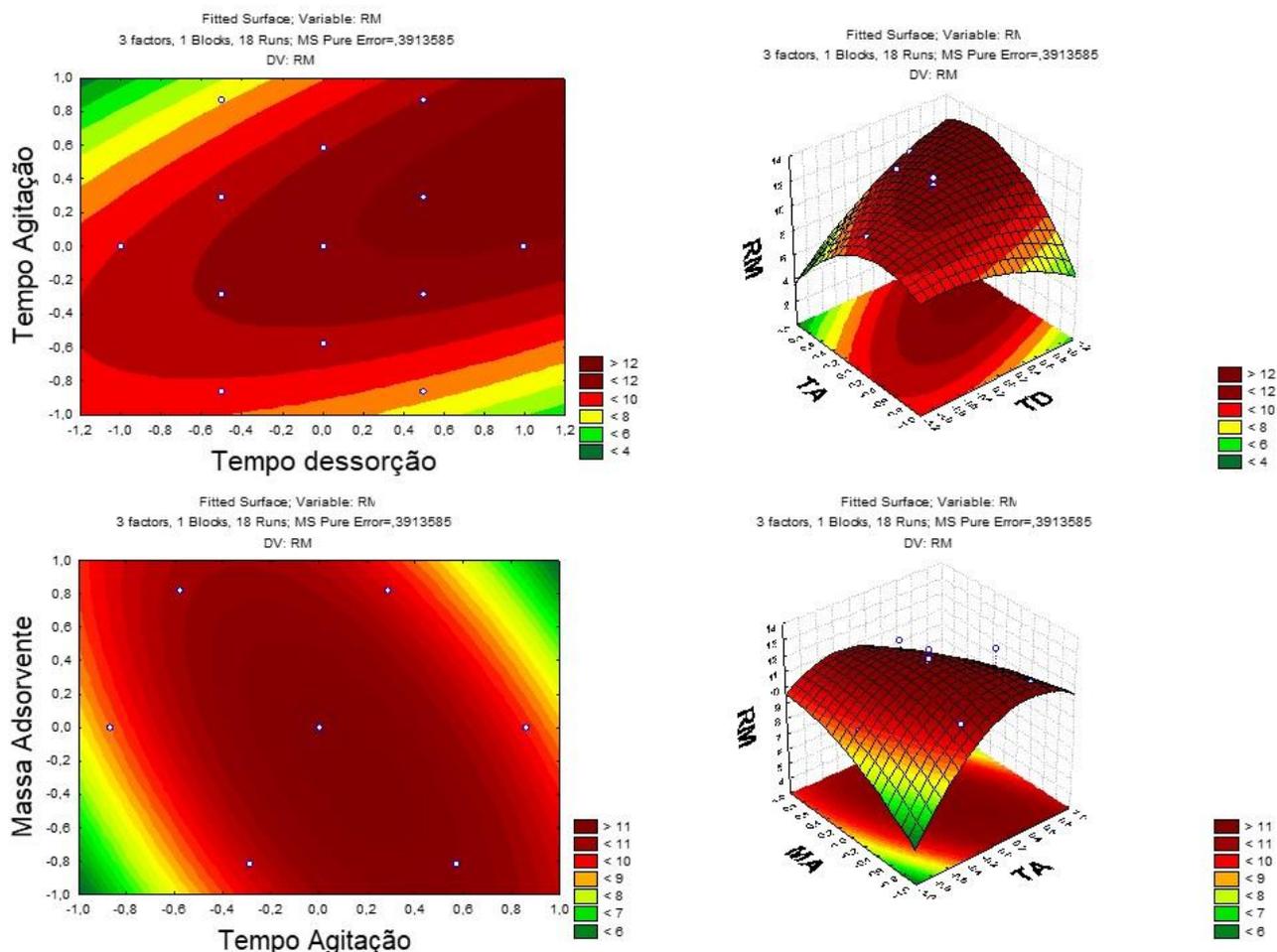


Figura 18 Diagrama e superfície de resposta resultante da otimização pela matriz de Doehlert. os pontos em branco representam cada experimento realizado, o gradiente de cor representa melhor resultado (em resposta múltipla-RM) conforme a tonalidade em vermelho escurece e os valores estão apresentados de forma codificada, as variáveis estudadas foram massa de adsorvente (MA), tempo de agitação (TA) e tempo de desorção (TD).

Tabela 13. Comprovação dos resultados da otimização

Comprovação	Tempo de desorção	Tempo de agitação	Massa de adsorvente	Resposta múltipla
Experimento 1	-0,553897	-0,457006	0,714478	12,34505052
Experimento 2	-0,553897	-0,457006	0,714478	11,64346593
Experimento 3	-0,553897	-0,457006	0,714478	12,90379124

A segunda forma de comprovação dos resultados da otimização é através da análise de variância (ANOVA), tabela 14, onde a razão entre a soma quadrática de cada fonte de variação

por seu respectivo número de graus de liberdade fornece o valor da média quadrática, e dividindo a média quadrática da regressão do modelo pela média quadrática do resíduo obtém-se a razão entre as duas variâncias podendo ser comparadas através do teste F (distribuição de Fisher) chegando o valor de F calculado. A comparação dentre o valor de F calculado e o F crítico afirma a significância do modelo, onde o modelo é dito como significativo se o valor de F calculado for maior que o valor de F crítico. De forma análoga a verificação de falta de ajuste pode ser feita comparado o F calculado para falta de ajuste com o F crítico, onde um F calculado menor que o F crítico significa que a falta de ajuste não é significativa. Logo podemos afirmar que o modelo matemático desenvolvido é significativo e a falta de ajuste é insignificante.

Tabela 14 Análise de variância (ANOVA, $p < 0,05$) do modelo matemático ajustado

	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	F(calculado)	F(crítico)
Modelo	30,93037	9	3,4367	9,6672	3,3880
Residual	2,84470	8	0,3555		
Falta de ajuste	0,88790	3	0,0986	1,2592	5,4090
Erro puro	1,95679	3	0,0783		

Validação

A validação fornece evidências objetivas por meio de ensaios experimentais, de forma a confirmar que os requisitos para o que o uso ou aplicação de uma metodologia estejam atendidos, assegurando a qualidade dos experimentos realizados com confiabilidade. Existem diferentes procedimentos e ou pré-requisitos para assegurar veracidade dos dados obtidos que podem variar a depender do objetivo do trabalho. Neste presente documento, o sistema de validação aplicado foi o conhecido como validação no laboratório (“*in house validation*”) objetivando o desenvolvimento de uma metodologia avaliando as características mais básicas de desempenho, satisfazendo os itens: seletividade, linearidade, precisão, exatidão, faixa linear, limite de detecção e limite de quantificação (Aragão, N.; Veloso e Andrade, 2009; Ribani, M.; Bottoli, C; Collins, C. H.; Jardim, I.; Melo, 2004).

Seletividade

A seletividade pode ser entendida como a capacidade de identificar ou quantificar uma espécie de interesse de forma inequívoca frente a componentes presentes na amostra, segundo a IUPAC (Thompson, Ellison e Wood, 2002), por este princípio a seletividade é considerada boa quando os resultados de interferência possam ser ignorados. Uma das formas mais comuns de se obter a seletividade em um método cromatográfico é verificar se existem picos de interferentes com tempos de retenção próximos aos picos do analitos ao comparar um cromatograma de uma amostra “branca” (ausência de analitos) com uma amostra enriquecida com o padrão dos analitos. Na figura 20 encontra-se os cromatogramas: A) amostra fortificada, B) branco, C) injeção direta dos padrões. Onde é possível perceber de forma nítida a diferença entre os cromatogramas e a clareza nos picos identificados.

Ao comparar o cromatograma da amostra “branca”, de uma marca de água mineral onde não foram encontrados nenhum dos 14 analitos, com a amostra fortificada, é possível concluir que à ausência de picos com tempo de retenção próximos aos dos analitos, e mesmo quando existem alguns picos no cromatograma estes não interferem na identificação dos analitos. Sendo assim, o método proposto pode ser considerado como seletivo na determinação destas substâncias.

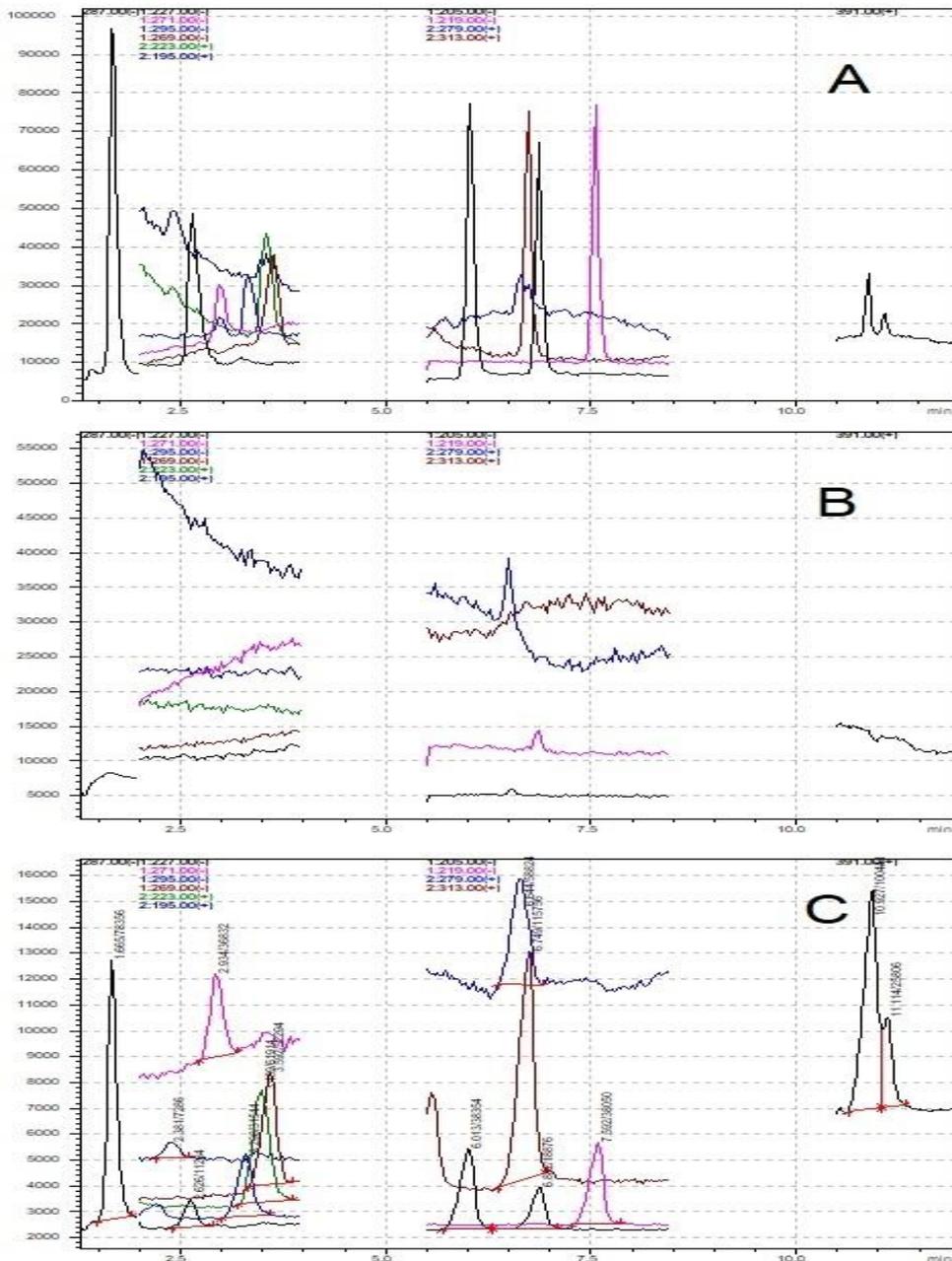


Figura 19 Comparação dos cromatogramas: A) amostra fortificada 500ngL^{-1} dos hormônios, alquilfenóis, BPA e 5000ngL^{-1} dos ftalatos. B) amostra "branco", C) injeção direta da mistura contendo os 14 padrões em metanol

Curva analítica e faixa linear

A linearidade ou faixa linear impõe os intervalos limites (mínimo e máximo) no qual um determinado método têm a capacidade de fornecer resultados que podem relacionar diretamente os sinais medidos com a concentração dos analitos. A relação entre o sinal medido e a concentração da espécie de interesse é determinada empiricamente a partir da construção de uma curva analítica, resultando em uma equação matemática capaz de estabelecer esta relação. A curva analítica foi obtida a partir da calibração externa, utilizando o procedimento de extração desenvolvido, com o mínimo de 5 pontos onde a concentração dos analitos variam de 50 ngL⁻¹ a 5000 ngL⁻¹ em água ultrapura.

Utilizou-se o modelo matemático de regressão linear para estimar os coeficientes da curva analítica a partir do conjunto de dados obtidos experimentalmente. Obteve-se a função da curva do tipo $y = ax + b$, onde “y” é o sinal medido, “a” coeficiente angular ou inclinação da reta, “b” coeficiente linear e “R²” a linearidade do modelo. A tabela 13 demonstra os resultados que representam a linearidade do método desenvolvido.

Tabela 15 Dados obtidos da curva analítica

Composto	TR (min)	m/z	E.Q. da Curva	Faixa de trabalho	R ²
Estriol	1.648	287	$y = 652,99x + 1452,5$	31-500 ng L ⁻¹	0,9943
BPA	2.615	227	$y = 309,59x - 3483,7$	21-500 ng L ⁻¹	0,9969
17β-estradiol	2.929	271	$y = 159,17x + 12767$	85-500 ng L ⁻¹	0,9724
17α-etinilestradiol	3.269	295	$y = 116,28x + 945,91$	45-500 ng L ⁻¹	0,9861
Estrona	3.569	269	$y = 246,89x + 38184$	50-500 ng L ⁻¹	0,9904
4-t-OP	5.978	205	$y = 538,17x - 2702,3$	21-500 ng L ⁻¹	0,9963
4-n-OP	6.841	205	$y = 270,03x - 1570,1$	29-500 ng L ⁻¹	0,9953
4-n-NP	7.564	219	$y = 330,13x + 2214,8$	31-500 ng L ⁻¹	0,9946
DMP	2.338	195	$y = 3127x + 2122,1$	800-5000 ng L ⁻¹	0,9745
DEP	3.479	223	$y = 40561x + 20342$	210-5000 ng L ⁻¹	0,9972
DBP	6.609	279	$y = 24872x + 91689$	870-5000 ng L ⁻¹	0,9759
BBP	6.707	313	$y = 140324x + 2862,1$	270-5000 ng L ⁻¹	0,9953
DEHP	10.899	391	$y = 2930,4x + 195,67$	240-5000 ng L ⁻¹	0,9941
DNOP	11.092	391	$y = 1505,3x + 902,33$	480-5000 ng L ⁻¹	0,9865

A faixa de trabalho para os hormônios, alquilfenóis e BPA variou de 21 a 500 ng L⁻¹, enquanto para os ftalatos este intervalo foi de 210 a 5000ngL⁻¹ concentrações comparativamente 10 vezes maiores que os demais, no entanto justificado pela maior dificuldade de ionização deste grupo de substâncias.

A linearidade do método desenvolvido foi avaliada a partir do coeficiente de correlação linear, onde os resultados variaram de 0,9724 a 0,9972, sendo considerado valores próximos ou maiores que 0,99 indicam um ajuste ideal dos dados ou níveis satisfatórios, levando em consideração a baixa concentração dos analitos (ngL^{-1}) e a realização do procedimento de extração.

Limites de detecção e quantificação

Concomitantemente à definição da faixa de trabalho, é importante conhecer os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) do método. O LD, segundo a IUPAC, pode ser descrito como a menor quantidade ou concentração de analito em uma amostra, que pode ser distinguida com segurança do zero (Thompson, Ellison e Wood, 2002). Neste presente trabalho, o LD é obtido a partir da curva analítica, onde este se iguala ao valor referente a três vezes o desvio padrão sobre o coeficiente angular da reta, sendo expresso da seguinte forma:

$$\text{LD} = 3x (s / S); \text{LQ} = 10x (s/S)$$

onde “s” representa o erro padrão da resposta e “S” é o coeficiente angular da curva analítica.

O limite de quantificação (LQ) conceitualmente representa a menor concentração possível de ser medida, mediante um determinado procedimento experimental. O limite de quantificação foi calculado a partir da curva analítica, no valor de dez vezes o desvio padrão sobre o coeficiente angular da reta.

Os resultados para o LD e LQ de cada um dos analitos estão descritos na tabela 16. O menor e maior valor para o limite de detecção variou entre 21 ng L^{-1} (BPA e 4-*t*-OP) e 85 ng L^{-1} para o 17β -estradiol dentre os hormônios, alquilfenóis e BPA, e dentre $0,21 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ (DEP) e $0,87 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ (DBP) para os ftalatos. Por outro lado, o limite de quantificação variou de 68 ng L^{-1} (BPA) até 284 ng L^{-1} (17β -estradiol) para o primeiro grupo e variou de $0,69 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ (DEP) até $2,9 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ (DBP).

Tabela 16 Limites de detecção e quantificação

ANALITO	LQ(ngL ⁻¹) 1)	LD(ngL ⁻¹) 1)	MÉTODO DE EXTRAÇÃO	MÉTODO DE DETECÇÃO	VOLUME DE AMOSTRA	REFERÊNCIA
Estriol	102	31	d-μ-SPE ¹	UFLC-MS	100 mL	Presente estudo
BPA	68	21	d-μ-SPE ¹	UFLC-MS	100 mL	Presente estudo
17β-estradiol	284	85	d-μ-SPE ¹	UFLC-MS	100 mL	Presente estudo
17α-etinil estradiol	151	45	d-μ-SPE ¹	UFLC-MS	100 mL	Presente estudo
Estrona	166	50	d-μ-SPE ¹	UFLC-MS	100 mL	Presente estudo
4- <i>t</i> -OP	70	21	d-μ-SPE ¹	UFLC-MS	100 mL	Presente estudo
4- <i>n</i> -OP	96	29	d-μ-SPE ¹	UFLC-MS	100 mL	Presente estudo
4- <i>n</i> -NP	102	31	d-μ-SPE ¹	UFLC-MS	100 mL	Presente estudo
DMP	2700	800	d-μ-SPE ¹	UFLC-MS	100 mL	Presente estudo
DEP	690	210	d-μ-SPE ¹	UFLC-MS	100 mL	Presente estudo
DBP	2900	870	d-μ-SPE ¹	UFLC-MS	100 mL	Presente estudo
BBP	890	270	d-μ-SPE ¹	UFLC-MS	100 mL	Presente estudo
DEHP	810	240	d-μ-SPE ¹	UFLC-MS	100 mL	Presente estudo
DNOP	1610	480	d-μ-SPE ¹	UFLC-MS	100 mL	Presente estudo
DMP, DEP, DBP	2400	700	Online-SPE	HPLC-UV	18 mL	(Salazar-Beltrán <i>et al.</i> , 2017)
E1,E2,EE2, E3, BPA, 4-N-OP, 4-N-NP	0,04-0,56	0,01-0,17	SPE	HPLC-MS/MS	500 mL	(Valcárcel <i>et al.</i> , 2018)
BPA	70	30	Injeção direta	HPLC-MS/MS	100 μL	(Chailurkit, Srijaruskul e Ongphiphadhanakul, 2017)
E2, BPA, 4- <i>n</i> -NP, DEHP	Não reportado	0,0027-18,1	SPE	HPLC-UV	10 L	(Chevolleau <i>et al.</i> , 2016)
BPA	42 070	12 750	Injeção direta ²	HPLC-UV	250 mL	(Pradhan <i>et al.</i> , 2020)
DBP	570	170	HS-SPME ³	GC-MS	20 mL	(Cincotta <i>et al.</i> , 2018)
E2, E3	Não informa	0,0003	Receptor mimic MIP ⁴	LC-Q-TOFMS	10 mL	(Yagishita <i>et al.</i> , 2019)
BPA	Não informa	1800	Impressão molecular	Espectrofotômetro Fluorescência	150 μL	(Üzek <i>et al.</i> , 2019)
E1, E2, EE2	0,03	0,01	SPE	Espectrofotômetro UV-VIS	1 L	(Rocha, M. J. <i>et al.</i> , 2019)

¹ microextração em fase sólida dispersiva.

² concentrou a amostra por evaporação e ressuspensão em 100uL.

³ “*Headspace*”- microextração em fase sólida.

⁴ adsorventes que mimetizam o receptor utilizando polímero com molecular impresso.

Até o presente momento não há na literatura um trabalho utilizando o conjunto de técnicas similares para a comparação direta. No entanto extrapolando a comparação com trabalhos realizados com outros instrumentos podemos observar resultados melhores, em termos de limite de detecção, do que reportado por alguns autores como Pradhan et al. (2020) que obteve LD de 12 750 ngL⁻¹ para o BPA em através da concentração de 250mL de amostra para 100 uL em um HPLC-UV, enquanto neste presente trabalho o LD para o BPA obtido foi de 21 ngL⁻¹. Contudo, sabe-se que o detector de massas é mais sensível que o um ultravioleta (UV), logo era de se esperar obter maior sensibilidade. Por outro lado, obteve-se também resultados comparáveis aos obtidos por Chailurkit et al. (2017) que utilizando um HPLC-MS/MS e por injeção direta atingiu o LD de 30 ngL⁻¹ para o BPA, neste ponto observa-se que a metodologia de preparo de amostra desenvolvida neste trabalho permitiu obter-se limites equivalentes utilizando um instrumento de detecção menos sofisticado. Por fim, observou-se que Chevolleau et al. (2016) utilizando um HPLC-UV obteve LD expressivos para um conjunto de analitos (E2, BPA, 4-*n*-NP, DEHP) entre 0,0027 e 18,1 ngL⁻¹ pois, o volume de amostra utilizado de 10L permitiu um fator de concentração de 5000 vezes, o que justifica os resultados encontrados.

Portanto, é possível concluir que a metodologia de análise desenvolvida é sensível o suficiente para obter resultados comparáveis com instrumentos mais sofisticados, graças ao preparo de amostra.

Precisão

A precisão avalia dispersão dos resultados individuais obtidos dentre réplicas de experimentos de uma mesma amostra, sua avaliação da pode ser inferida a partir da repetição dos resultados individuais sobre condições pré-definidas. Os resultados obtidos a partir das réplicas em um mesmo dia (*intra-day*) resulta na repetibilidade dentro das mesmas condições experimentais durante um curto intervalo de tempo, enquanto a repetibilidade em dias consecutivos (*inter-day*), expressa a precisão em um intervalo de tempo intermediário.

Os dados para avaliação da precisão foram obtidos a partir dos resultados do tempo de retenção e do sinal da área de integração dos picos pertencentes a cada um dos padrões na concentração intermediária da curva (2,5µgL⁻¹ para os ftalatos e 250ngL⁻¹ demais analitos,

executadas em 9 experimentos em triplicata durante três dias seguidos. Dessa forma, os tempos de retenção e sinal da área de integração foram avaliados em relação ao desvio padrão relativo (RSD), os resultados são exibidos na tabela 17.

Tabela 17 Resultados dos testes de precisão intra e interdia

COMPOSTO	INTRADIA N=9			INTERDIA N=27	
	m/z	RSD (%)		RSD(%)	
		TR	Área	TR	Área
E3	287	0,24	6,84	0,27	10,18
BPA	227	0,34	2,85	0,38	15,84
E2	271	0,64	6,68	0,91	16,39
E2	295	0,52	4,42	0,52	17,53
E1	269	0,39	6,86	0,45	16,82
4- <i>t</i> -OP	205	0,30	5,82	0,31	11,30
4- <i>n</i> -OP	205	0,13	7,38	0,18	10,32
4- <i>n</i> -NP	219	0,11	8,28	0,17	11,73
DMP	195	0,83	17,31	1,50	22,17
DEP	223	0,38	13,49	0,48	21,53
DBP	279	1,32	9,78	0,92	14,48
BBP	313	0,15	7,42	0,50	14,16
DEHP	391	0,19	13,55	0,18	24,60
DNOP	391	0,16	17,60	0,20	28,08

Os resultados em porcentagem obtidos em termos de RSD para o tempo de retenção variaram entre 0,11 a 1,32% nos testes intradia e dentre 0,17 a 1,50% no teste interdia, onde os desvios abaixo de 2% são reportados satisfatórios, de acordo com Thompson et al (2002). Com relação ao desvio padrão relativo obtido pela área do pico, as variações foram de 2,85 a 17,6% no teste intradia e de 10,18 a 28,08% sendo que o DNOP e DEHP foram os compostos que apresentaram maior dispersão, no entanto os valores de RSD se mantiveram abaixo dos 30% como sugerido pela IUPAC (Thompson, Ellison e Wood, 2002), logo podemos concluir que a metodologia desenvolvida é precisa.

Exatidão

A exatidão de um método analítico é medida através da coincidência entre os resultados individuais para um dado método frente a um valor aceito como referência, a forma usual de se medir a exatidão é através de um material certificado de referência (CRM), no entanto na ausência de um CRM, a exatidão pode ser investigada através de um teste de fortificação e recuperação (Thompson, Ellison e Wood, 2002). Neste presente trabalho avaliou-se a exatidão a partir dos ensaios de recuperação, com fortificação (*spiking*), em água mineral. A avaliação ocorreu através da observação dos resultados das amostras em triplicata com três níveis de concentração diferentes. O fator de recuperação calculado pode ser entendido como a fração da quantidade de analito extraída e quantificada do total presente inserida na amostra.

Neste procedimento foram adicionadas as amostras uma quantidade conhecida de padrão em três níveis de fortificação. Para os hormônios, alquilfenóis e BPA os níveis de fortificação foram 0; 15,0 e 25,0 ng, para os ftalatos os níveis foram 0;150,0 e 250,0 ng.

O fator de recuperação (R) foi calculado subtraindo-se da área do pico encontrada na amostra fortificada (A_2) da área encontrada na amostra não fortificada (A_1) e dividindo-se o resultado pela área prevista pela curva de calibração para concentração equivalente a massa adicionada (A_3), o resultado foi multiplicando 100 e expresso em %, conforme equação a seguir:

$$\text{Recuperação} = \frac{A_2(\text{amostra fortificada}) - A_1(\text{branco})}{A_3(\text{curva de calibração})} \times 100 \quad \text{eq. 4}$$

Os resultados obtidos do teste de recuperação estão apresentados na tabela 18, mostrando valores distintos para cada um dos analitos. As taxas de recuperação variaram de 62,5 a 82,1% para os alquilfenóis (4-*t*-OP, 4-*n*-NP e NP) mantendo-se o desvio padrão relativo (RSD) menor do que 20%; por outro lado, para o BPA a recuperação foi de 93,4 a 106,2% com RSD de até 10,5%. Os hormônios estriol, 17 β -estradiol, 17 α -etinilestradiol e estrona, apresentaram valores de recuperação dentre 81,8 e 98,7% com RDS até 9,1%. No entanto para os ftalatos, dimetil, dietil e dibutil o desempenho ficou dentre 76,9 e 113,3% com o maior RDS para o DMP de 16,8%; já o resultado para o BBP teve taxa de recuperação variando entre 59,1 e 70,7% com RSD de 14,8%; por último, DEHP e DNOP apresentaram resultado abaixo do esperado variando de 29 a 51,9% com RSD de 13,4%. Com exceção do DEHP e DNOP, os resultados se mantiveram dentro da faixa de recuperação de 50 a 120% com precisão melhor que 20%, levando à conclusão de que o procedimento apresentou uma boa recuperação para os demais analitos.

Tabela 18 Resultado do teste de recuperação

	A*		B**		C***	
	Média	RSD	Média	RSD(%)	Média	RSD(%)
Estriol	-	<LD	83,5	0,8	81,8	3,6
BPA	-	<LD	93,4	9,7	106,2	10,5
17 β -estradiol	-	<LD	95,3	3,9	96,6	5,1
17 α - etinilestradiol	-	<LD	98,0	7,1	91,0	2,3
Estrona	-	<LD	98,7	9,1	88,9	0,1
4- <i>t</i> -OP	-	<LD	75,0	16,4	75,3	11,0
4- <i>n</i> -OP	-	<LD	82,1	10,3	78,6	15,5
4- <i>n</i> -NP	-	<LD	66,9	19,8	62,5	12,9
DMP	-	<LD	97,0	16,8	83,4	7,3
DEP	-	<LD	96,4	6,3	113,3	5,5
DBP	-	<LD	76,9	8,1	91,9	4,1
BBP	-	<LD	70,7	12,5	59,1	14,8
DEHP	-	<LD	50,7	5,5	51,9	13,4
DNOP	-	<LD	37,6	3,5	29,0	2,6

*Amostra sem adição de padrão.

**Amostra com adição de 150 ng L⁻¹ dos hormônios, BPA, alquilfenóis e 1500 ng L⁻¹ dos ftalatos.

*** Amostra com adição de 250 ng L⁻¹ dos hormônios, BPA, alquilfenóis e 2500 ng L⁻¹ dos ftalatos.

Aplicação em amostras reais

Objetivando demonstrar a aplicabilidade do método proposto, foram analisadas dez amostras de três diferentes marcas de água mineral, de marca popular, vendidas em embalagens plásticas de polipropileno (500 mL), adquiridas em diferentes mercados. As amostras foram armazenadas sob diferentes condições até o momento da análise, duas amostras (A e B) da marca “1” foram armazenadas no interior do barco, sem refrigeração, onde a temperatura durante o dia pode ultrapassar 40°C, por um período maior que uma semana, simulando uma situação real de armazenamento. Outras duas amostras (C e D) da marca “1” foram aquecidas a 50°C por (12h), em banho termostático, simulando uma situação genérica de armazenamento em local de alta temperatura, e analisadas no dia posterior. As outras 6 amostras (E, F, G, H, I, J) da marca “2” e “3” foram armazenadas a temperatura ambiente, em local seco e sem incidência direta de raios solares, até o momento da análise.

Dentre os IE avaliados neste presente trabalho, BPA e DMP foram encontrados nas amostras de água mineral em garrafas de 500 mL de polipropileno A, B, C e D resultados exibidos na tabela 19, enquanto nas demais amostras não foram encontrados quantidades detectáveis de nenhum dos IE estudados. Ambos os analitos encontrados são plastificantes comumente utilizados na produção de embalagens plásticas que podem migrar para o conteúdo através do contato direto, o cromatograma representativo das amostras contendo estes analitos está exibido na figura 20.

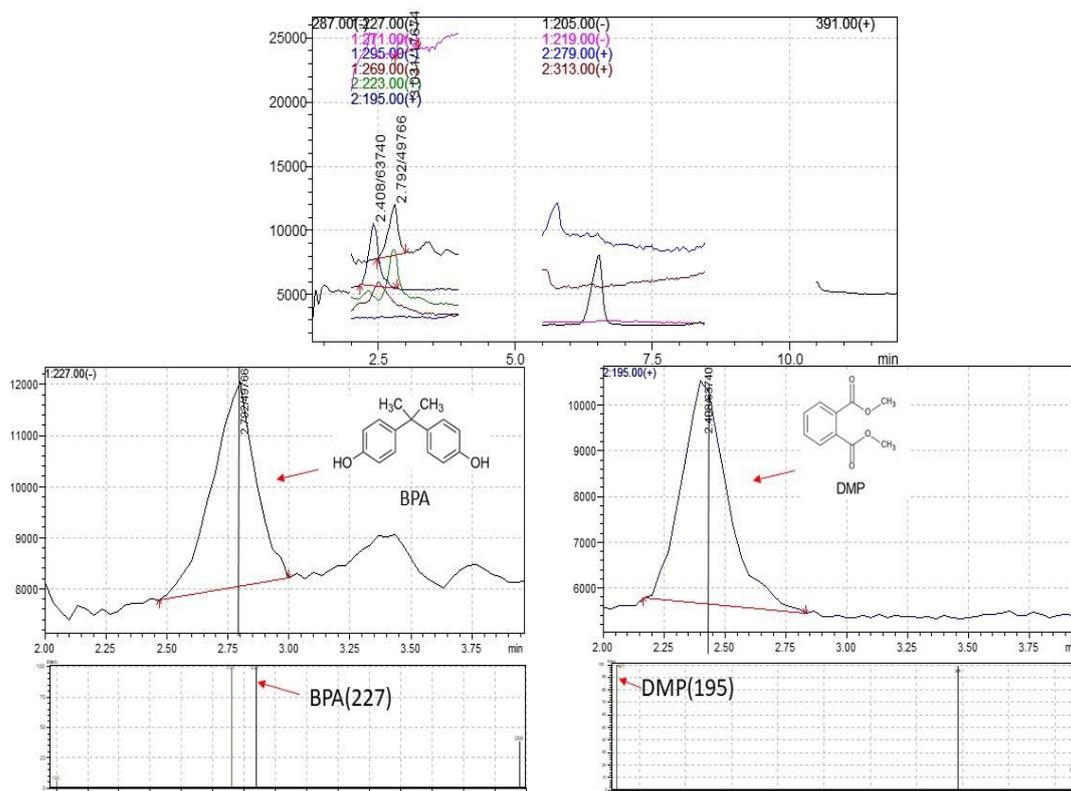


Figura 20. Cromatograma de uma amostra de água mineral contaminada com BPA e DMP.

Devido as concentrações acima do LD só terem sido encontradas nas garrafas que foram aquecidas, concluiu-se que o efeito da temperatura seja o aspecto crítico na migração destas substâncias para os alimentos, bem como reportado por outros estudos (Aneck-Hahn *et al.*, 2018; Bach *et al.*, 2014; Luo *et al.*, 2018). O aumento da temperatura favorece a migração destas espécies, pois o acréscimo na energia cinética média das moléculas aumenta a probabilidade destas se desprenderem das paredes do polímero, migrando para a solução, e por outro lado ocasiona o aumento da solubilidade em água.

Segundo J. Li (Li *et al.*, 2020) a tolerância de ingestão diária publicado pela *European Food Safety Authority* (EFSA) de $4 \mu\text{g kg}^{-1}$ peso corporal/dia de BPA pode não ser totalmente seguro. No entanto supondo que um indivíduo esteja ingerindo 2,5 litros de água por dia contendo 1257 ng L^{-1} ($1,257 \mu\text{g L}^{-1}$), este estaria sendo exposto a aproximadamente $3,1 \mu\text{g}$ por

esta fonte, um valor bem abaixo da tolerância diária para um indivíduo adulto, tendo em vista que um indivíduo de massa corporal de 70kg possa resistir até 280 $\mu\text{g dia}^{-1}$. Todavia, esta fonte de exposição pode ser evitada e se somada a contaminação por outras formas de exposição podem causar danos à saúde.

Tabela 19 Avaliação da presença dos IEs nas amostras de água mineral exposto em ng L^{-1}

AMOSTRA	(A)	(B)	(C)	(D)	(E,F,G,H,I,J)
E3	<31	<31	<31	<31	<31
BPA	584	351	1149	1257	<21
E2	<85	<85	<85	<85	<85
EE2	<45	<45	<45	<45	<45
E1	<50	<50	<50	<50	<50
4- <i>t</i> -OP	<21	<21	<21	<21	<21
4- <i>n</i> -OP	<29	<29	<29	<29	<29
4- <i>n</i> -NP	<31	<31	<31	<31	<31
DMP	72548	50393	47333	57304	<800
DEP	<210	<210	<210	<210	<210
DBP	<870	<870	<870	<870	<870
BBP	<270	<270	<270	<270	<270
DEHP	<240	<240	<240	<240	<240
DNOP	<480	<480	<480	<480	<480

A e B: amostras armazenadas no interior do barco, onde a temperatura durante o dia pode ultrapassar 40°C, por um período maior que uma semana; C e D: amostras aquecidas a 50°C por (12h), em banho termostático; E, F, G, H, I, J: amostras armazenadas a temperatura ambiente, em local seco e sem incidência direta de raios solares.

A respeito do DMP, a concentração estimada de até 72548 ng L^{-1} (aproximadamente 72,5 $\mu\text{g L}^{-1}$) tabela 15, pode representar risco a saúde humana. A estimativa da tolerância diária para o DMP é de 10 $\mu\text{g kg}^{-1}$ peso corporal/dia segundo a EFSA. Logo seguindo o cálculo de

estimativa proposto em Zaki (Zaki e Shoeib, 2018) um indivíduo de 70kg de peso corporal teria a tolerância diária de 700µg de DMP por dia, portanto a ingestão de 2,5 litros de água mineral nestas condições representaria 26% do limite diário de exposição, representando um risco moderado se somado a outras fontes de exposição e ou podendo até ser considerado um caso grave na exposição de indivíduos de baixo peso corporal.

Portanto, conclui-se que presença do BPA e DMP em água mineral pode representar um fator de risco para a população quando as embalagens forem aquecidas ou armazenadas sobre altas temperaturas. A ausência de sinal para os demais ftalatos e alquilfenóis sugere que estes não façam parte da composição do material plástico utilizado nestas garrafas, ou que estejam sendo utilizados em uma quantidade muito pequena. Por outro lado, a ausência de sinal para os hormônios é um indicio que a fonte de água mineral utilizada não está tendo contato direto com excreções humanas, por outro lado, análises microbiológicas são necessárias para confirmar esta informação, tendo em vista que estes hormônios são produzidos naturalmente pelo corpo humano e excretados pela urina, fezes e outros fluidos corporais.

7. Conclusão

A metodologia de trabalho desenvolvida para avaliação de IEs em matriz aquosa demonstrou ser simples, de fácil aplicação, utiliza volume reduzido de amostra e solventes orgânicos e permitiu a detecção dos interferentes endócrinos na concentração de ngL⁻¹ em amostras de água mineral. O procedimento analítico desenvolvido teve resultados validados exibindo níveis satisfatórios de sensibilidade, precisão e exatidão.

Dentre os compostos estudados o BPA e DMP foram encontrados em amostras de água mineral adquiridas no mercado local, que passaram por processo de aquecimento, em concentrações capazes de contribuir com risco a saúde humana.

O presente trabalho representa uma contribuição à sociedade, visto que existem poucas informações disponíveis na literatura acerca do risco associado a contaminação por este conjunto de IE em água mineral no Brasil, onde as condições de clima, transporte e armazenamento podem acelerar o processo de migração destas espécies. Assim, este presente estudo alerta sobre a possibilidade de contaminação e necessidade de investigações mais amplas.

Perspectivas futuras

- Avaliação de diferentes tipos de embalagens, volumes e marcas de água mineral comercializadas na cidade de Salvador, verificando locais de armazenamento.
- Verificar como o processo de armazenamento e transporte deste material pode afetar a migração destes compostos em diferentes condições temperaturas, exposição solar e a longo prazo.
- Adequação da metodologia para aplicação em diferentes matrizes aquosas, como a água distribuída pelo sistema público de abastecimento e também água do mar, rios e efluentes.

8. Referências Bibliográficas

ACIR, I. H.; GUENTHER, K. Endocrine-disrupting metabolites of alkylphenol ethoxylates – A critical review of analytical methods, environmental occurrences, toxicity, and regulation. **Science of the Total Environment**, v. 635, p. 1530–1546, 2018.

ADENUGA, A. A.; AYINUOLA, O.; ADEJUYIGBE, E. A.; OGUNFOWOKAN, A. O. Biomonitoring of phthalate esters in breast-milk and urine samples as biomarkers for neonates' exposure, using modified quechers method with agricultural biochar as dispersive solid-phase extraction absorbent. **Microchemical Journal**, v. 152, n. August 2019, p. 104277, 2020.

ALI, M.; SATTARI, M.; YADEGHARI, A.; AKBAR, A.; NABIL, A. Air-assisted Liquid-liquid Microextraction vs. Dispersive Liquid-liquid Microextraction; A Comparative Study for the Analysis of Multiclass Pesticides. **Analytical and Bioanalytical Chemistry Research**, v. 6, n. 1, p. 29–46, 2019.

AMARO, A. A.; ESPOSITO, A. I.; MIRISOLA, V.; MEHILLI, A.; ROSANO, C.; NOONAN, D. M.; ALBINI, A.; PFEFFER, U.; ANGELINI, G. Endocrine Disruptor Agent Nonyl Phenol Exerts An Estrogen-like Transcriptional Activity on Estrogen Receptor Positive Breast Cancer Cells. **Current Medicinal Chemistry**, v. 21, n. 5, p. 630–640, 2014.

AMIRIDOU, D.; VOUTSA, D. Alkylphenols and phthalates in bottled waters. **Journal of Hazardous Materials**, v. 185, n. 1, p. 281–286, 2011.

AN, J.; CHOI, K.; YANG, S.; NAM, K. Estimation of human-origin estrone and 17 β -estradiol concentrations in the Han River, Seoul, South Korea and its uncertainty-based ecological risk characterization. **Science of the Total Environment**, v. 633, p. 1148–1155, 2018.

ANASTASSIADE, M.; LEHOTAY, S. J. Fast and Easy Multiresidue Method Employing Acetonitrile Extraction/Partitioning and “Dispersive Solid-Phase Extraction” for the Determination of Pesticide Residues in Produce. **RESIDUES AND TRACE ELEMENTS**, v. 86, n. 2, p. 412–431, 1 jun. 2003.

ANDREA, G.; HEATHER, P.; DANIEL, R.; LEONARDO, T. **HORMONES AND ENDOCRINE DISRUPTING CHEMICALS WHAT YOU NEED TO KNOW**. Disponível em: <https://www.hormone.org/-/media/hormone/files/infographics/hhn_aug_infographic_edcs.pdf?la=en>. Acesso em: 30 abr. 2019.

ANECK-HAHN, N. H.; ZIJL, M. C. VAN; SWART, P.; TRUEBODY, B.; GENTHE, B.; CHARMIER, J.; JAGER, C. DE. Estrogenic activity, selected plasticizers and potential health risks associated with bottled water in South Africa. **Journal of Water and Health**, v. 16, n. 2, p. 253–262, 2018.

ARAGÃO, N.; VELOSO, M.; ANDRADE, J. Validação de métodos cromatográficos de análise- Um experimento de fácil aplicação utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e os princípios da “química verde” na determinação de metilxantinas em bebidas. **Química Nova**, v. 32, n. 9, p. 2476–2481, 2009.

BACH, C.; DAUCHY, X.; CHAGNON, M. C.; ETIENNE, S. Chemical compounds and toxicological assessments of drinking water stored in polyethylene terephthalate (PET) bottles: A source of controversy reviewed. **Water Research**, v. 46, n. 3, p. 571–583, 2012.

BACH, C.; DAUCHY, X.; SEVERIN, I.; MUNOZ, J.-F.; ETIENNE, S.; CHAGNON, M.-C. Effect of sunlight exposure on the release of intentionally and/or non-intentionally added substances from polyethylene terephthalate (PET) bottles into water: Chemical analysis and in vitro toxicity. **Food Chemistry**, v. 162, p. 63–71, nov. 2014.

BARBER, L. B.; LOYO-ROSALES, J. E.; RICE, C. P.; MINARIK, T. A.; OSKOUIE, A. K. Endocrine disrupting alkylphenolic chemicals and other contaminants in wastewater treatment plant effluents, urban streams, and fish in the Great Lakes and Upper Mississippi River Regions. **Science of the Total Environment**, v. 517, p. 195–206, 2015.

BECKMAN, E. **World Economic Forum**. Disponível em: <<https://www.weforum.org/agenda/2018/08/the-world-of-plastics-in-numbers>>. Acesso em: 3 mar. 2020.

BILAL, M.; ADEEL, M.; RASHEED, T.; ZHAO, Y.; IQBAL, M. N. Emerging contaminants of high concern and their enzyme-assisted biodegradation – A review. **Environment International**, v. 124, n. October 2018, p. 336–353, 2019.

BLANCO, M.; RIZZI, J.; FERNANDES, D.; COLIN, N.; MACEDA-VEIGA, A.; PORTE, C. Science of the Total Environment Assessing the impact of waste water effluents on native fish species from a semi-arid region, NE Spain. **Science of the Total Environment**, v. 654, p. 218–225, 2019.

BÓKONY, V.; ÜVEGES, B.; UJHEGYI, N.; VEREBÉLYI, V.; NEMESHÁZI, E.;

CSÍKVÁRI, O.; HETTYEY, A. Endocrine disruptors in breeding ponds and reproductive health of toads in agricultural, urban and natural landscapes. **Science of the Total Environment**, v. 634, p. 1335–1345, 2018.

BOSKER, T.; SANTORO, G.; MELVIN, S. D. Salinity and sensitivity to endocrine disrupting chemicals: A comparison of reproductive endpoints in small-bodied fish exposed under different salinities. **Chemosphere**, v. 183, p. 186–196, 2017.

CAPDEVILLE, M. J.; BUDZINSKI, H. Trace-level analysis of organic contaminants in drinking waters and groundwaters. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 30, n. 4, p. 586–606, 2011.

CARNEVALI, O.; GIORGINI, E.; CANUTI, D.; MYLONAS, C. C.; FORNER-PIQUER, I.; MARADONNA, F. Diets contaminated with Bisphenol A and Di-isononyl phthalate modify skeletal muscle composition : A new target for environmental pollutant action. **Science of the Total Environment**, v. 658, p. 250–259, 2019.

CHAE, Y.; KIM, D.; KIM, S. W.; AN, Y. Trophic transfer and individual impact of nano-sized polystyrene in a four-species freshwater food chain. **Scientific Reports**, n. February 2017, p. 1–11, 2018.

CHAILURKIT, L.; SRIJARUSKUL, K.; ONGPHIPHADHANAKUL, B. Bisphenol A in Canned Carbonated Drinks and Plastic-Bottled Water from Supermarkets. **Exposure and Health**, v. 9, n. 4, p. 243–248, 21 dez. 2017.

CHEN, X.; XU, S.; TAN, T.; LEE, S. T.; CHENG, S. H.; LEE, F. W. F.; XU, S. J. L.; HO, K. C. Toxicity and estrogenic endocrine disrupting activity of phthalates and their mixtures. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 11, n. 3, p. 3156–3168, 2014.

CHEVOLLEAU, S.; DEBRAUWER, L.; STROHEKER, T.; VIGLINO, L.; MOURAHIB, I.; MEIRELES, M. H.; GRIMALDI, M.; BALAGUER, P.; GIOIA, L. DI. A consolidated method for screening the endocrine activity of drinking water. **Food Chemistry**, v. 213, p. 274–283, 2016.

CHIN, H. B.; MARIE, A.; WILCOX, A. J.; WEINBERG, C. R.; FERGUSON, K. K.; CALAFAT, A. M.; MCCONNAUGHEY, D. R.; BAIRD, D. D. Association of urinary concentrations of phthalate metabolites and bisphenol A with early pregnancy endpoints. **Environmental Research**, v. 168, n. October 2018, p. 254–260, 2019.

CHORMEY, D. S.; BÜYÜKPINAR, Ç.; TURAK, F.; KOMESLI, O. T.; BAKIRDERE, S. Simultaneous determination of selected hormones, endocrine disruptor compounds, and pesticides in water medium at trace levels by GC-MS after dispersive liquid-liquid microextraction. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 189, n. 6, 2017.

CICHNA-MARKL, M. Sample clean-up by sol-gel immunoaffinity chromatography for the determination of bisphenol A in food and urine. **Methods**, v. 56, n. 2, p. 186–191, 2012.

CINCOTTA, F.; VERZERA, A.; TRIPODI, G.; CONDURSO, C. Non-intentionally added substances in PET bottled mineral water during the shelf-life. **European Food Research and Technology**, v. 244, n. 3, p. 433–439, 2018.

COOPER, J. E.; KENDIG, E. L.; BELCHER, S. M. Assessment of Bisphenol A Released from Reusable Plastic, Aluminium and Stainless Steel Water Bottles. **Chemosphere**, v. 85, n. 6, p. 943–947, 2012.

DABEER, S.; AFJAL, M. A.; AHMAD, S.; FATIMA, M.; HABIB, H.; PARVEZ, S.; RAISUDDIN, S. Transgenerational effect of parental obesity and chronic parental bisphenol A exposure on hormonal profile and reproductive organs of preadolescent Wistar rats of F1 generation: A one-generation study. **Human and Experimental Toxicology**, v. 39, n. 1, p. 59–76, 2020.

DANIELS, K. D.; VANDERVORT, D.; WU, S.; LEUSCH, F. D. L.; MERWE, J. P. VAN DE; JIA, A.; SNYDER, S. A. Downstream trends of in vitro bioassay responses in a wastewater effluent-dominated river. **Chemosphere**, v. 212, p. 182–192, 2018.

DAY, P.; GREEN, R. M.; GROSS, M.; WELTJE, L.; WHEELER, J. R. Endocrine Disruption: Current approaches for regulatory testing and assessment of plant protection products are fit for purpose. **Toxicology Letters**, v. 296, n. May, p. 10–22, 2018.

DEBLONDE, T.; COSSU-LEGUILLE, C.; HARTEMANN, P. Emerging pollutants in wastewater: A review of the literature. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, v. 214, n. 6, p. 442–448, 2011.

DHAINI, H. R.; NASSIF, R. M. Exposure assessment of endocrine disruptors in bottled drinking water of Lebanon. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 186, n. 9, p. 5655–5662, 2014.

DIANA, A.; DIMITRA, V. Alkylphenols and phthalates in bottled waters. **Journal of Hazardous Materials**, v. 185, n. 1, p. 281–286, 2011.

DIDUCH, M. Chemical Quality of Bottled Waters : A Review. v. 76, n. 9, p. 178–196, 2011.

DOEHLERT, D. H. Uniform Shell Designs. **Applied Statistics**, v. 19, n. 3, p. 231, 1970.

ELISABET, P. Differential Toxicity of Alkylphenols in JEG-3 Human Placental Cells : Alteration of P450 Aromatase and Cell Lipid Composition. v. 167, n. 2, p. 336–346, 2019.

EUROPE, P. **Plastics – the Facts 2018**. Disponível em: <https://www.plasticseurope.org/application/files/6315/4510/9658/Plastics_the_facts_2018_A_F_web.pdf>. Acesso em: 3 mar. 2020.

FAN, Y. *et al.* Prenatal low-dose DEHP exposure induces metabolic adaptation and obesity:

Role of hepatic thiamine metabolism. **Journal of Hazardous Materials**, v. 385, n. June 2019, p. 121534, 2020.

FORREST, A.; GIACOVAZZI, L.; DUNLOP, S.; REISSER, J.; TICKLER, D.; JAMIESON, A.; MEEUWIG, J. J. Eliminating plastic pollution: How a voluntary contribution from industry will drive the circular plastics economy. **Frontiers in Marine Science**, v. 6, n. SEP, p. 1–11, 2019.

FRY, D. M. Reproductive effects in birds exposed to pesticides and industrial chemicals. **Environmental Health Perspectives**, v. 103, n. SUPPL. 7, p. 165–171, 1995.

FRY, D. M.; TOONE, C. K. DDT-induced feminization of gull embryos. **Science**, v. 213, n. 4510, p. 922–924, 1981.

GALLO, F.; FOSSI, C.; WEBER, R.; SANTILLO, D.; SOUSA, J.; INGRAM, I.; NADAL, A.; ROMANO, D. Marine litter plastics and microplastics and their toxic chemicals components : the need for urgent preventive measures. **Environmental Sciences Europe**, 2018.

GARCÍA-CÓRCOLES, M. T.; CIPA, M.; RODRÍGUEZ-GÓMEZ, R.; RIVAS, A.; OLEA-SERRANO, F.; VÍLCHEZ, J. L.; ZAFRA-GÓMEZ, A. Determination of bisphenols with estrogenic activity in plastic packaged baby food samples using solid-liquid extraction and clean-up with dispersive sorbents followed by gas chromatography tandem mass spectrometry analysis. **Talanta**, v. 178, n. April 2017, p. 441–448, 2018.

GARFÍ, M.; CADENA, E.; SANCHEZ-RAMOS, D.; FERRER, I. Life cycle assessment of drinking water : Comparing conventional water treatment , reverse osmosis and mineral water in glass and plastic bottles. **Journal of Cleaner Production**, v. 137, p. 997–1003, 2016.

GARSIDE, M. **Global PET bottle production 2004-2021**. Disponível em: <<https://www.statista.com/statistics/723191/production-of-polyethylene-terephthalate-bottles-worldwide/>>. Acesso em: 3 mar. 2020.

GHORBANI, M.; CHAMSAZ, M.; AGHAMOHAMMADHASAN, M.; SHAMS, A. Ultrasonic assisted magnetic dispersive solid phase microextraction for pre concentration of serotonin–norepinephrine reuptake inhibitor drugs. **Analytical Biochemistry**, v. 551, n. April, p. 7–18, 2018.

GOGOLA, J.; HOFFMANN, M.; PTAK, A. Chemosphere Persistent endocrine-disrupting chemicals found in human follicular fluid stimulate the proliferation of granulosa tumor spheroids via GPR30 and IGF1R but not via the classic estrogen receptors. **Chemosphere**, v. 217, p. 100–110, 2019.

GONZÁLEZ-ROJO, S.; LOMBÓ, M.; FERNÁNDEZ-DÍEZ, C.; HERRÁEZ, M. P. Male exposure to bisphenol a impairs spermatogenesis and triggers histone hyperacetylation in zebrafish testes. **Environmental Pollution**, v. 248, p. 368–379, 2019.

GROH, K. J. *et al.* Overview of known plastic packaging-associated chemicals and their hazards. **Science of the Total Environment**, v. 651, n. October 2018, p. 3253–3268, 2019.

GUILLETTE, L. J.; PICKFORD, D. B.; CRAIN, D. A.; ROONEY, A. A.; PERCIVAL, H. F. Reduction in penis size and plasma testosterone concentrations in juvenile alligators living in a contaminated environment. **General and comparative endocrinology**, v. 101, n. 1, p. 32–42, jan. 1996.

GÜNTHER, K.; RÄCKER, T.; BÖHME, R. An Isomer-Specific Approach to Endocrine-Disrupting Nonylphenol in Infant Food. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 65, n. 6, p. 1247–1254, 2017.

HAEYOUN, R. K.; LEE, K. Y. Evaluation of 4-nonylphenol and bisphenol A toxicity using multiple molecular biomarkers in the water flea *Daphnia magna*. **Ecotoxicology**, p. 167–174, 2019.

HALLDIN, K. Impact of endocrine disrupting chemicals on reproduction in Japanese quail. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 29, n. 2, p. 420–429, 2005.

HAMIDI, S.; NEMATI, M. Terephthalic acid determination in mineral water stored in PET bottles using a novel magnetic dispersive micro solid-phase extraction followed by high-performance liquid chromatography. **Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit**, v. 14, n. 2, p. 173–177, 2019.

HAO, L.; WANG, CHENHUAN; MA, X.; WU, Q.; WANG, CHUN; WANG, Z. Magnetic three-dimensional graphene solid-phase extraction coupled with high performance liquid chromatography for the determination of phthalate esters in fruit juice. **Analytical Methods**, v. 6, n. 15, p. 5659–5665, 2014.

HASHEMIPOUR, M.; KELISHADI, R.; AMIN, M. M.; EBRAHIM, K. Is there any association between phthalate exposure and precocious puberty in girls? **Environmental Science and Pollution Research**, v. 25, n. 14, p. 13589–13596, 2018.

HOUTMAN, C. J.; BROEK, R. TEN; BROUWER, A. Steroid hormonal bioactivities, culprit natural and synthetic hormones and other emerging contaminants in waste water measured using bioassays and UPLC-tQ-MS. **Science of the Total Environment**, v. 630, p. 1492–1501, 2018.

HUANG, G.; LIANG, Y.; LIU, Y.; SHI, W.; LIU, S. Swine farm wastewater discharge causes masculinization of western mosquito fish (*Gambusia affinis*). **Environment International journal**, v. 123, n. October 2018, p. 132–140, 2019.

IBGE. **Projeções e estimativas da população do Brasil e das Unidades da Federação**. Disponível em: <<https://www.ibge.gov.br/apps/populacao/projecao/>>. Acesso em: 18 fev. 2020.

ISMAIL, N. A. H.; WEE, S. Y.; ARIS, A. Z. Bisphenol A and alkylphenols concentrations in selected mariculture fish species from Pulau Kukup, Johor, Malaysia. **Marine Pollution Bulletin**, v. 127, n. December 2017, p. 536–540, 2018.

JEDDI, M. Z.; RASTKARI, N.; AHMADKHANIHA, R.; YUNESIAN, M. Endocrine disruptor phthalates in bottled water: daily exposure and health risk assessment in pregnant and lactating women. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 188, n. 9, 2016.

JURADO, A.; VÁZQUEZ-SUÑÉ, E.; CARRERA, J.; LÓPEZ, M.; ALDA, D.; PUJADES, E.; BARCELÓ, D. Emerging organic contaminants in groundwater in Spain : A review of sources , recent occurrence and fate in a European context. **Science of the Total Environment**, The, v. 440, p. 82–94, 2012.

KIM, D.; KWAK, J. IL; AN, Y. J. Effects of bisphenol A in soil on growth, photosynthesis activity, and genistein levels in crop plants (*Vigna radiata*). **Chemosphere**, v. 209, p. 875–882, 2018.

KIM, I.; LEE, S.; DON, S. Determination of toxic organic pollutants in fine particulate matter using selective pressurized liquid extraction and gas chromatography – tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1590, p. 39–46, 2019.

KIM, S.; CHU, K. H.; AL-HAMADANI, Y. A. J.; PARK, C. M.; JANG, M.; KIM, D. H.; YU, M.; HEO, J.; YOON, Y. Removal of contaminants of emerging concern by membranes in water and wastewater: A review. **Chemical Engineering Journal**, v. 335, n. November 2017, p. 896–914, 2018.

KUIPER, G. G. J. M.; LEMMEN, J. G.; CARLSSON, B. O.; CORTON, J. C.; SAFE, S. H.; SAAG, P. T. V. A. N. D. E. R.; BURG, B. V. A. N. D. E. R.; GUSTAFSSON, J.-ÅKE. Interaction of Estrogenic Chemicals and Phytoestrogens with Estrogen Receptor β . **Endocrinology**, v. 139, n. 10, p. 4252–4263, 2017.

LAMASTRA, L.; BALDERACCHI, M.; TREVISAN, M. Inclusion of emerging organic contaminants in groundwater monitoring plans. **MethodsX**, v. 3, n. May, p. 459–476, 2016.

LAMPREA, K.; BRESSY, A.; MIRANDE-BRET, C.; CAUPOS, E.; GROMAIRE, M. C. Alkylphenol and bisphenol A contamination of urban runoff: an evaluation of the emission potentials of various construction materials and automotive supplies. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 25, n. 22, p. 21887–21900, 2018.

LEBRETON, L.; ANDRADY, A. Future scenarios of global plastic waste generation and disposal. **Palgrave Communications**, v. 5, n. 1, p. 1–11, 2019.

LEJONKLOU, M. H.; DUNDER, L.; BLADIN, E.; PETTERSSON, V.; RÖNN, M.; LIND, L.; WALDÉN, T. B.; LIND, P. M. Effects of low-dose developmental bisphenol a exposure on metabolic parameters and gene expression in male and female fischer 344 rat offspring.

Environmental Health Perspectives, v. 125, n. 6, p. 1–13, 2017.

LI, J.; WANG, Y.; LI, K.; CAO, Y.; WU, S.; WU, L. Trends in Analytical Chemistry Advances in different configurations of solid-phase microextraction and their applications in food and environmental analysis. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 72, p. 141–152, 2015.

LI, J.; ZHANG, W.; ZHAO, H.; ZHOU, Y.; XU, S.; LI, Y.; XIA, W.; CAI, Z. Trimester-specific, gender-specific, and low-dose effects associated with non-monotonic relationships of bisphenol A on estrone, 17 β -estradiol and estriol. **Environment International**, v. 134, n. September 2019, 2020.

LI, J.; ZHAO, H.; XIA, W.; ZHOU, Y.; XU, S.; CAI, Z. Nine phthalate metabolites in human urine for the comparison of health risk between population groups with different water consumptions. **Science of the Total Environment**, v. 649, p. 1532–1540, 2019.

LIANG, J.; JIN, T.; KIM, J.; CHOI, Y. Simultaneous roasting and extraction of green coffee beans by pressurized liquid extraction. **Food Chemistry**, v. 281, n. May 2018, p. 261–268, 2019.

LINDGREN, C.; SOFIE, S.; ANNE, C.; VINGGAARD, M.; AXELSTAD, M.; HASS, U. Anogenital distance as a toxicological or clinical marker for fetal androgen action and risk for reproductive disorders. **Archives of Toxicology**, v. 93, n. 2, p. 253–272, 2019.

LISBOA, N. S.; FAHNING, C. S.; COTRIM, G.; ANJOS, J. P. DOS; ANDRADE, J. B. DE; HATJE, V.; ROCHA, G. O. DA. A simple and sensitive UFLC-fluorescence method for endocrine disrupters determination in marine waters. **Talanta**, v. 117, n. December, p. 168–175, 2013.

LIU, M.; JIA, S.; DONG, T.; HAN, Y.; XUE, J.; WANJAYA, E. R.; FANG, M. The occurrence of bisphenol plasticizers in paired dust and urine samples and its association with oxidative stress. **Chemosphere**, v. 216, p. 472–478, 2019.

LIZ, M. V. DE; AMARAL, B. DO; STETS, S.; NAGATA, N.; PERALTA-ZAMORA, P. Sensitive estrogens determination in wastewater samples by HPLC and fluorescence detection. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 28, n. 8, p. 1453–1460, 2017.

LOYO-ROSALES, J. E.; ROSALES-RIVERA, G. C.; LYNCH, A. M.; RICE, C. P.; TORRENTS, A. Migration of Nonylphenol from Plastic Containers to Water and a Milk Surrogate. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 7, p. 2016–2020, 2004.

LUO, Q.; LIU, Z. HUA; YIN, H.; DANG, Z.; WU, P. XIAO; ZHU, N. WU; LIN, Z.; LIU, Y. Migration and potential risk of trace phthalates in bottled water: A global situation. **Water Research**, v. 147, p. 362–372, 2018.

MA, L.; YATES, S. R. Dissolved organic matter and estrogen interactions regulate estrogen removal in the aqueous environment: A review. **Science of the Total Environment**, v. 640–

641, p. 529–542, 2018.

MAGGIONI, S.; BALAGUER, P.; CHIOZZOTTO, C.; BENFENATI, E. Screening of endocrine-disrupting phenols, herbicides, steroid estrogens, and estrogenicity in drinking water from the waterworks of 35 Italian cities and from PET-bottled mineral water. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 20, n. 3, p. 1649–1660, 2013.

MARKETS, R. AND. **Global Bisphenol A Market Report 2018: Analysis 2013-2017 & Forecasts 2018-2023**. Disponível em: <<https://www.prnewswire.com/news-releases/global-bisphenol-a-market-report-2018-analysis-2013-2017--forecasts-2018-2023-300757673.html>>. Acesso em: 12 fev. 2020.

MEFFE, R.; BUSTAMANTE, I. DE. Emerging organic contaminants in surface water and groundwater: A first overview of the situation in Italy. **Science of the Total Environment**, v. 481, n. 1, p. 280–295, 2014.

MELO, A. F.; ADOLFO, G.; PINTO, S.; LOPES, A.; FERREIRA, D. O. Effects of 17 α -ethinylestradiol on embryo survival, hatchability and larval deformities in African catfish, *Clarias gariepinus*. **Journal of Environmental Biology**, v. 39, n. September, p. 3–6, 2017.

MNGUNI, S.; SCHOEMAN, C.; MARAIS, S.; CUKROWSKA, E.; CHIMUKA, L. Determination of oestrogen hormones in raw and treated water samples by reverse phase ultra-fast liquid chromatography mass spectrometry – a case study in Johannesburg South, South Africa. **Water SA**, v. 44, n. 1 January, p. 111–117, 31 jan. 2018.

MOSS, G. P.; COLLEGE, Q. M.; ROAD, M. E.; LONDON, E. NOMENCLATURE OF STEROIDS. **International Union of Pure and Applied Chemistry**, v. 61, n. 10, p. 1783–1822, 1989.

MOSTAFA, A.; SHAABAN, H. Development and validation of a dispersive liquid–liquid microextraction method for the determination of phthalate esters in perfumes using gas chromatography-mass spectrometry. **RSC Advances**, v. 8, n. 47, p. 26897–26905, 2018.

MPUPA, A.; MASHILE, G. P.; NOMNGONGO, P. N. Ultrasound-assisted dispersive solid phase nanoextraction of selected personal care products in wastewater followed by their determination using high performance liquid chromatography-diode array detector. **Journal of Hazardous Materials**, v. 370, n. July 2018, p. 33–41, 2019.

MUHAMMAD, R.; AHAD, K.; MEHBOOB, F. Extraction techniques for pesticide residues analysis in edible oils and role of sorbents in cleanup. **SEPARATION SCIENCE PLUS**, n. August 2019, p. 1–12, 21 jan. 2020.

NASCIMENTO, M. M.; ROCHA, G. O.; ANDRADE, J. B. Simple and effective dispersive micro-solid phase extraction procedure for simultaneous determination of polycyclic aromatic compounds in fresh and marine waters. **Talanta**, v. 204, n. April, p. 776–791, 2019.

NATIONS, U. **World Population Prospects 2019: Highlights**. Disponível em: <<https://www.un.org/development/desa/publications/world-population-prospects-2019-highlights.html>>. Acesso em: 7 fev. 2020.

NICOLE, W. Phthalates in fast food: A potential dietary source of exposure. **Environmental Health Perspectives**, v. 124, n. 10, p. A191, 2016.

NIU, S.; ZHANG, C. Endocrine Disrupting Compounds from the Source Water of the Huai River (Huainan City), China. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 74, n. 3, p. 471–483, 2018.

OCHAROEN, Y.; BOONPHAKDEE, C.; BOONPHAKDEE, T.; SHINN, A. P.; MOONMANGMEE, S. High levels of the endocrine disruptors bisphenol-A and 17 β -estradiol detected in populations of green mussel, *Perna viridis*, cultured in the Gulf of Thailand. **Aquaculture**, v. 497, n. July, p. 348–356, 2018.

OEHLMANN, J.; OETKEN, M.; SCHULTE-OEHLMANN, U. A critical evaluation of the environmental risk assessment for plasticizers in the freshwater environment in Europe, with special emphasis on bisphenol A and endocrine disruption. **Environmental Research**, v. 108, n. 2, p. 140–149, 2008.

OLUKOLE, S. G.; AJANI, S. O.; OLA-DAVIES, E. O.; LANIPEKUN, D. O.; AINA, O. O.; OYEYEMI, M. O.; OKE, B. O. Melatonin ameliorates bisphenol A-induced perturbations of the prostate gland of adult Wistar rats. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 105, n. May, p. 73–82, 2018.

ORSET, C.; BARRET, N.; LEMAIRE, A. How consumers of plastic water bottles are responding to environmental policies ? **Waste Management**, v. 61, p. 13–27, 2017.

PAMPLONA-SILVA, M. T.; MAZZEO, D. E. C.; BIANCHI, J.; MARIN-MORALES, M. A. Estrogenic Compounds: Chemical Characteristics, Detection Methods, Biological and Environmental Effects. **Water, Air, and Soil Pollution**, v. 229, n. 5, 2018.

PEREIRA, J.; SELBOURNE, C.; POÇAS, F. Determination of phthalates in olive oil from European market. **Food Control**, v. 98, n. October 2018, p. 54–60, 2019.

PERKINELMER, I. **Rapid LC/MS/MS Analysis of Phthalates**. Disponível em: <https://www.perkinelmer.com/lab-solutions/resources/docs/APP-Rapid-LCMSMS-Analysis-of-Phthalates-012766A_01.pdf>. Acesso em: 4 fev. 2020.

PHILIP, J. M.; ARAVIND, U. K.; ARAVINDAKUMAR, C. T. Emerging contaminants in Indian environmental matrices – A review. **Chemosphere**, v. 190, p. 307–326, 2018.

Plastic Waste Management Market. Disponível em: <<https://www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/plastic-waste-management-market-80259244.html>>. Acesso em: 18 fev. 2020.

PRADHAN, R.; KRISHNA, K. V.; WADHWA, G.; TALIYAN, R.; KHADGAWAT, R.; KACHHAWA, G.; SINGHVI, G.; DUBEY, S. K. QbD-driven development and validation of HPLC method for determination of Bisphenol A and Bis-sulphone in environmental samples. **International Journal of Environmental Analytical Chemistry**, v. 100, n. 1, p. 42–54, 2 jan. 2020.

QUATTRINI, S. Natural mineral waters: chemical characteristics and health effects. **Clinical Cases in Mineral and Bone Metabolism**, v. 13, n. 3, p. 173–180, 2016.

RASHTIAN, J.; CHAVKIN, D. E.; MERHI, Z. Water and soil pollution as determinant of water and food quality/contamination and its impact on female fertility. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 17, n. 1, p. 1–13, 2019.

RASTKARI, N.; JEDDI, M. Z.; YUNESIAN, M.; AHMADKHANIHA, R. Effect of sunlight exposure on phthalates migration from plastic containers to packaged juices. **Journal of Environmental Health Science and Engineering**, v. 16, n. 1, p. 27–33, 2018.

REHMAN, SABA; USMAN, Z.; REHMAN, SABEEN; ALDRAIHEM, M.; REHMAN, N.; REHMAN, I.; AHMAD, G. Endocrine disrupting chemicals and impact on male reproductive health. **Translational Andrology and Urology**, v. 7, n. 3, p. 490–503, 2018.

REZG, R.; EL-FAZAA, S.; GHARBI, N.; MORNAGUI, B. Bisphenol A and human chronic diseases: Current evidences, possible mechanisms, and future perspectives. **Environment International**, v. 64, p. 83–90, 2014.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I.; MELO, L. VALIDAÇÃO EM MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS E ELETROFORÉTICOS. **Quim. Nova**, v. 27, n. 5, p. 771–780, 2004.

RIVA, F.; CASTIGLIONI, S.; FATTORE, E.; MANENTI, A.; DAVOLI, E.; ZUCCATO, E. Monitoring emerging contaminants in the drinking water of Milan and assessment of the human risk. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, v. 221, n. 3, p. 451–457, 2018.

ROCHA, B. A.; OLIVEIRA, S. R. DE; SILVA, R. M. DA; BARCELOS, G. R. M.; OLIVEIRA, A. R. M. DE; BARBOSA, F. An eco-friendly sample preparation procedure base on low-density solvent-based air-assisted liquid-liquid microextraction for the simultaneous determination of 21 potential endocrine disruptors in urine samples by liquid chromatography-tandem mass spectro. **Microchemical Journal**, v. 147, n. January, p. 207–214, 2019.

ROCHA, M. J.; MADUREIRA, T. V.; VENAIDE, C. S.; MARTINS, I.; CAMPOS, J.; ROCHA, E. Presence of estrogenic endocrine disruptors in three European estuaries in Northwest Iberian Peninsula (Portugal). **Toxicological and Environmental Chemistry**, v. 101, n. 3–6, p. 244–264, 2019.

ROGERS, J. A.; MIRZA, R. S. The effects of bisphenol-a on the immune system of wild yellow perch, *Perca flavescens*. **Water, Air, and Soil Pollution**, v. 224, n. 10, p. 1–6, 2013.

RONQUEST-ROSS, L.-C.; VINK, N.; SIGGE, G. Food consumption changes in South Africa since 1994. **South African Journal of Science**, v. 111, n. 9/10, p. 1–12, 25 set. 2015.

ROSENBERG, K. DIETHYLSTILBESTROL EXPOSURE IN PREGNANCY LINKED TO MULTIGENERATIONAL NEURODEVELOPMENTAL DEFICITS. **American Journal of Nursing**, v. 118, n. 9, p. 2018, 2018.

SALAUDEEN, T.; OKOH, O.; AGUNBIADE, F.; OKOH, A. Fate and impact of phthalates in activated sludge treated municipal wastewater on the water bodies in the Eastern Cape, South Africa. **Chemosphere**, v. 203, p. 336–344, 2018.

SALAZAR-BELTRÁN, D.; HINOJOSA-REYES, L.; PALOMINO-CABELLO, C.; TURNES-PALOMINO, G.; HERNÁNDEZ-RAMÍREZ, A.; GUZMÁN-MAR, J. L. Determination of phthalate acid esters plasticizers in polyethylene terephthalate bottles and its correlation with some physicochemical properties. **Polymer Testing**, v. 68, n. November 2017, p. 87–94, 2018.

SALAZAR-BELTRÁN, D.; HINOJOSA-REYES, L.; RUIZ-RUIZ, E.; HERNÁNDEZ-RAMÍREZ, A.; LUIS GUZMÁN-MAR, J. Determination of phthalates in bottled water by automated on-line solid phase extraction coupled to liquid chromatography with uv detection. **Talanta**, v. 168, n. March, p. 291–297, 2017.

SALCEDO, G. M.; KUPSKI, L.; DEGANG, L.; MARUBE, L. C.; CALDAS, S. S. Determination of fifteen phenols in wastewater from petroleum refinery samples using a dispersive liquid — liquid microextraction and liquid chromatography with a photodiode array detector. **Microchemical Journal**, v. 146, n. January, p. 722–728, 2019.

SALGUEIRO-GONZÁLEZ, N.; CONCHA-GRAÑA, E.; TURNES-CAROU, I.; MUNIATEGUI-LORENZO, S.; LÓPEZ-MAHÍA, P.; PRADA-RODRÍGUEZ, D. Blank and sample handling troubleshooting in ultratrace analysis of alkylphenols and bisphenol A by liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Talanta**, v. 101, p. 413–419, 2012.

SALGUEIRO-GONZÁLEZ, N.; MUNIATEGUI-LORENZO, S.; LÓPEZ-MAHÍA, P.; PRADA-RODRÍGUEZ, D. Trends in analytical methodologies for the determination of alkylphenols and bisphenol A in water samples. **Analytica Chimica Acta**, v. 962, p. 1–14, 2017.

SANTOS, W. P. C.; CASTRO, J. T.; BEZERRA, M. A.; FERNANDES, A. P.; FERREIRA, S. L. C.; KORN, M. G. A. Application of multivariate optimization in the development of an ultrasound-assisted extraction procedure for multielemental determination in bean seeds samples using ICP OES. **Microchemical Journal**, v. 91, n. 2, p. 153–158, 2009.

SCHECTER, A. *et al.* Phthalate concentrations and dietary exposure from food purchased in New York state. **Environmental Health Perspectives**, v. 121, n. 4, p. 473–479, 2013.

SETYANINGSIH, W.; SAPUTRO, I. E.; CARRERA, C. A.; PALMA, M. Optimisation of an ultrasound-assisted extraction method for the simultaneous determination of phenolics in rice grains. **Food Chemistry**, v. 288, n. March, p. 221–227, 2019.

SHAFEI, A.; RAMZY, M. M.; HEGAZY, A. I.; HUSSENY, A. K.; EL-HADARY, U. G.; TAHA, M. M.; MOSA, A. A. The molecular mechanisms of action of the endocrine disrupting chemical bisphenol A in the development of cancer. **Gene**, v. 647, n. September 2017, p. 235–243, 2018.

SIMAZAKI, D.; KUBOTA, R.; SUZUKI, T.; AKIBA, M. ScienceDirect Occurrence of selected pharmaceuticals at drinking water purification plants in Japan and implications for human health. **Water Research**, v. 76, p. 187–200, 2015.

SOTO, A. M.; JUSTICIA, H.; WRAY, J. W.; SONNENSCHNEIN, C. Para-Nonyl-Phenol - an Estrogenic Xenobiotic Released from Modified Polystyrene. **Environmental Health Perspectives**, v. 92, n. Cd, p. 167–173, 1991.

SOUZA-SILVA, É. A.; GIONFRIDDO, E.; PAWLISZYN, J. Trends in Analytical Chemistry A critical review of the state of the art of solid-phase microextraction of complex matrices II . Food analysis. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 71, p. 236–248, 2015.

SOUZA, G. **INTERFERENTES ENDÓCRINOS EM AMBIENTES ESTUARINOS**. [s.l: s.n.].

STREET, M. E. *et al.* Current knowledge on endocrine disrupting chemicals (EDCs) from animal biology to humans, from pregnancy to adulthood: Highlights from a national italian meeting. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 6, 2018.

SUMPTER, J. P. Xenoendocrine disruptors--environmental impacts. **Toxicology letters**, v. 102–103, p. 337–342, 1998.

SUN, J.; HUANG, J.; ZHANG, A.; LIU, W.; CHENG, W. Occurrence of phthalate esters in sediments in Qiantang River, China and inference with urbanization and river flow regime. **Journal of Hazardous Materials**, v. 248–249, n. 1, p. 142–149, 2013.

SZENDI, K.; GYÖNGYI, Z.; KONTÁR, Z.; GERENCSÉR, G.; BERÉNYI, K.; HANZEL, A.; FEKETE, J.; KOVÁCS, A.; VARGA, C. Mutagenicity and Phthalate Level of Bottled Water Under Different Storage Conditions. **Exposure and Health**, v. 10, n. 1, p. 51–60, 15 mar. 2018.

TEDX. **The Endocrine Disruption Exchange**. Disponível em: <[https://endocrinedisruption.org/interactive-tools/tedx-list-of-potential-endocrine-disruptors/search-the-tedx-](https://endocrinedisruption.org/interactive-tools/tedx-list-of-potential-endocrine-disruptors/search-the-tedx-list#sname=&searchfor=any&sortby=chemname&action=search&searchcats=all&sortby=che)

mname>. Acesso em: 5 mar. 2020.

TEODOSIU, C.; GILCA, A. F.; BARJOVEANU, G.; FIORE, S. Emerging pollutants removal through advanced drinking water treatment: A review on processes and environmental performances assessment. **Journal of Cleaner Production**, v. 197, p. 1210–1221, 2018.

THOMPSON, M.; ELLISON, S. L. R.; WOOD, R. Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis (IUPAC Technical Report). **Pure and Applied Chemistry**, v. 74, n. 5, p. 835–855, 1 jan. 2002.

TRUDEAU, V.; TYLER, C. Endocrine disruption. **General and Comparative Endocrinology**, v. 153, n. 1–3, p. 13–14, ago. 2007.

TUDURÍ, E.; MARROQUI, L.; SANTOS, R. S. DOS; QUESADA, I.; FUENTES, E.; ALONSO-MAGDALENA, P. Timing of Exposure and Bisphenol-A: Implications for Diabetes Development. **Frontiers in Endocrinology**, v. 9, n. October, p. 1–10, 31 out. 2018.

TUZIMSKI, T.; SZUBARTOWSKI, S. Method Development for Selected Bisphenols Analysis in Sweetened Condensed Milk from a Can and Breast Milk Samples by HPLC–DAD and HPLC–QqQ–MS: Comparison of Sorbents (Z-SEP, Z-SEP Plus, PSA, C18, Chitin and EMR-Lipid) for Clean-Up of QuEChERS Extract. **Molecules**, v. 24, n. 11, p. 2093, 1 jun. 2019.

TYLER, C. R.; ROUTLEDGE, E. J. Oestrogenic effects in fish in English rivers with evidence of their causation. **Pure and Applied Chemistry**, v. 70, p. 1795–1804, 1998.

United States Environmental Protection Agency. Disponível em: <<https://www.epa.gov/endocrine-disruption/what-endocrine-system>>. Acesso em: 4 dez. 2018.

ÜZEK, R.; SARI, E.; ŞENEL, S.; DENIZLI, A.; MERKOÇI, A. A nitrocellulose paper strip for fluorometric determination of bisphenol A using molecularly imprinted nanoparticles. **Microchimica Acta**, v. 186, n. 4, 2019.

VAGI, S. J.; AZZIZ-BAUMGARTNER, E.; SJÖDIN, A.; CALAFAT, A. M.; DUMESIC, D.; GONZALEZ, L.; KATO, K.; SILVA, M. J.; YE, X.; AZZIZ, R. Exploring the potential association between brominated diphenyl ethers, polychlorinated biphenyls, organochlorine pesticides, perfluorinated compounds, phthalates, and bisphenol a in polycystic ovary syndrome: A case-control study. **BMC Endocrine Disorders**, v. 14, n. 1, 2014.

VALCÁRCEL, Y.; VALDEHÍTA, A.; BECERRA, E.; LÓPEZ DE ALDA, M.; GIL, A.; GORGA, M.; PETROVIC, M.; BARCELÓ, D.; NAVAS, J. M. Determining the presence of chemicals with suspected endocrine activity in drinking water from the Madrid region (Spain) and assessment of their estrogenic, androgenic and thyroidal activities. **Chemosphere**, v. 201, p. 388–398, 2018.

VALLEJO-RODRÍGUEZ, R.; SÁNCHEZ-TORRES, P. B.; LÓPEZ-LÓPEZ, A.; LEÓN-BECERRIL, E.; MURILLO-TOVAR, M. Detection of Steroids in Tap and Drinking Water

Using an Optimized Analytical Method by Gas Chromatography–Mass Spectrometry. **Exposure and Health**, p. 189–199, 2017.

VILA, M.; LAMAS, J. P.; GARCIA-JARES, C.; DAGNAC, T.; LLOMPART, M. Optimization of an analytical methodology for the simultaneous determination of different classes of ultraviolet filters in cosmetics by pressurized liquid extraction – gas chromatography tandem mass. **Journal of Chromatography A**, v. 1405, p. 12–22, 2015.

VIÑAS, P.; CAMPILLO, N.; LÓPEZ-GARCÍA, I.; HERNÁNDEZ-CÓRDOBA, M. Dispersive liquid–liquid microextraction in food analysis. A critical review. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 406, n. 8, p. 2067–2099, 27 mar. 2014.

VIÑAS, P.; CAMPILLO, N.; PASTOR-BELDA, M.; OLLER, A.; HERNÁNDEZ-CÓRDOBA, M. Determination of phthalate esters in cleaning and personal care products by dispersive liquid–liquid microextraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1376, p. 18–25, jan. 2015.

VINCENZO, M.; AVINO, P.; NOTARDONATO, I. Fast analysis of phthalates in freeze-dried baby foods by ultrasound-vortex-assisted liquid-liquid microextraction coupled with gas chromatography-ion trap / mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1474, p. 1–7, 2016.

VOGEL, S. A. The politics of plastics: the making and unmaking of bisphenol a “safety”. **American journal of public health**, v. 99 Suppl 3, p. 559–566, 2009.

WANG, R.; MA, X.; ZHANG, X.; LI, X.; LI, D.; DANG, Y. C8-modified magnetic graphene oxide based solid-phase extraction coupled with dispersive liquid-liquid microextraction for detection of trace phthalate acid esters in water samples. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 170, n. October 2018, p. 789–795, 2019.

WATABE, Y.; OGURA, T.; HIRANO, I.; NAKAYAMA, S. F. Analysis of phthalate esters in environmental water samples by online-SPE-LC coupled with high-speed triple quadruple mass spectrometer ASMS 2012 Materials & Methods. p. 1–5, 2012.

WEBER, A. A.; MOREIRA, D. P.; MELO, R. M. C.; RIBEIRO, Y. M.; BAZZOLI, N.; RIZZO, E. Environmental exposure to oestrogenic endocrine disruptors mixtures reflecting on gonadal sex steroids and gametogenesis of the neotropical fish *Astyanax rivularis*. **General and Comparative Endocrinology**, v. 279, n. December 2018, p. 99–108, 2019.

WEE, S. Y.; ARIS, A. Z. Endocrine disrupting compounds in drinking water supply system and human health risk implication. **Environment International**, v. 106, n. April, p. 207–233, 2017.

WEIZHEN, Z.; XIAOWEI, Z.; PENG, G.; NING, W.; ZINI, L.; JIAN, H.; ZHENG, Z. Distribution and risk assessment of phthalates in water and sediment of the Pearl River Delta. **Environmental Science and Pollution Research**, 2020.

WEN, Z.; HUANG, X.; GAO, D.; LIU, G.; FANG, C.; SHANG, Y.; DU, J.; ZHAO, Y.; LV, L.; SONG, K. Phthalate esters in surface water of Songhua River watershed associated with land use types, Northeast China. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 25, n. 8, p. 7688–7698, 2018.

WRIGHT, S. L.; KELLY, F. J. Plastic and Human Health: A Micro Issue? **Environmental Science & Technology**, v. 51, n. 12, p. 6634–6647, 20 jun. 2017.

XU, R.; GAO, H. T.; ZHU, F.; CAO, W. X.; YAN, Y. H. M.; ZHOU, X.; XU, Q.; JI, W. L. SPE-UPLC-MS/MS for the determination of phthalate monoesters in rats urine and its application to study the effects of food emulsifier on the bioavailability of priority controlling PAEs. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 1012–1013, p. 97–105, 2016.

YAGISHITA, M.; KUBO, T.; NAKANO, T.; SHIRAIISHI, F.; TANIGAWA, T.; NAITO, T.; SANO, T.; NAKAYAMA, S. F.; NAKAJIMA, D.; OTSUKA, K. Efficient extraction of estrogen receptor–active compounds from environmental surface water via a receptor-mimic adsorbent, a hydrophilic PEG-based molecularly imprinted polymer. **Chemosphere**, v. 217, p. 204–212, 2019.

YAN, Y.; LU, Y.; WANG, B.; GAO, Y.; GE, J.; LIANG, H.; WU, D. Facile preparation of a hydrophilic magnetic hybrid nanomaterial with solid-phase extraction capability for highly efficient enrichment of phthalates in environmental water. **Analytical Methods**, v. 10, n. 24, p. 2924–2930, 2018.

YANG, O.; KIM, H. L.; WEON, J.-I.; SEO, Y. R. Endocrine-disrupting Chemicals: Review of Toxicological Mechanisms Using Molecular Pathway Analysis. **Journal of Cancer Prevention**, v. 20, n. 1, p. 12–24, 2015.

YANG, Y.; SIK, Y.; KIM, K.; KWON, E. E.; FAI, Y. Science of the Total Environment Occurrences and removal of pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in drinking water and water / sewage treatment plants : A review. **Science of the Total Environment**, v. 596–597, p. 303–320, 2017.

YING, G.; WILLIAMS, B.; KOOKANA, R. Environmental fate of alkylphenols and alkylphenol ethoxylates — a review. **Environment International** 28, v. 28, n. February 2002, p. 215–226, 2002.

ZAKI, G.; SHOEIB, T. Concentrations of several phthalates contaminants in Egyptian bottled water: Effects of storage conditions and estimate of human exposure. **Science of The Total Environment**, v. 618, p. 142–150, mar. 2018.

ZHANG, H.; ZHOU, Q.; XIE, Z.; ZHOU, Y.; TU, C.; FU, C.; MI, W.; EBINGHAUS, R.; CHRISTIE, P.; LUO, Y. Occurrences of organophosphorus esters and phthalates in the

microplastics from the coastal beaches in north China. **Science of the Total Environment**, v. 616–617, p. 1505–1512, 2018.

ZHENG, X.; YAN, Z.; LIU, P.; LI, H.; ZHOU, J.; WANG, Y.; FAN, J.; LIU, Z. Derivation of aquatic life criteria for four phthalate esters and their ecological risk assessment in Liao River. **Chemosphere**, v. 220, p. 802–810, 2019.

ZHOU, L.; CHEN, H.; XU, Q.; HAN, X.; ZHAO, Y.; SONG, X.; ZHAO, T.; YE, L. The effect of di-2-ethylhexyl phthalate on inflammation and lipid metabolic disorder in rats. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 170, n. November 2018, p. 391–398, abr. 2019.

ZHU, W.; ZHANG, H.; TONG, C.; XIE, C.; FAN, G.; ZHAO, S.; YU, X.; TIAN, Y.; ZHANG, J. Environmental exposure to triclosan and semen quality. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 13, n. 2, p. 1–12, 2016.